

HOCHSCHULE FÜR TECHNIK UND WIRTSCHAFT DES SAARLANDES

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Bio-Chemie

Praktikums-Skript

Dozent:	Ko-Autoren:
Prof. Dr. Rainer Eisenmann	Ehrlich, Lehmberg

Fakultät: Ingenieurswesen

Studiengang: BMB (Biomedizinische Technik Bachelor)

Fach: Biochemie

Stand: Sommersemester 2010

Inhalt

Quellenhinweise:
VL: Versuch nach Bernd Löwe, Biochemie, Bamberg: C.C Buchner
VF: Versuch nach Hartmut Follmann, Biochemie, Stuttgart: B.G. Teubner
VB: Versuch von BioRad

0 Allgemeine Hinweise

0.1 Dokumentationshinweise:

Volumenmessung:

- Bei ca. Angaben schätzen oder im Becherglas,
- Genaue Angaben mit Meßzylinder bzw. Pipetten abmessen.
- Verdünnte wäßrige Lösungen oder Stoffe mit bekannter Dichte kann man auch abwiegen.

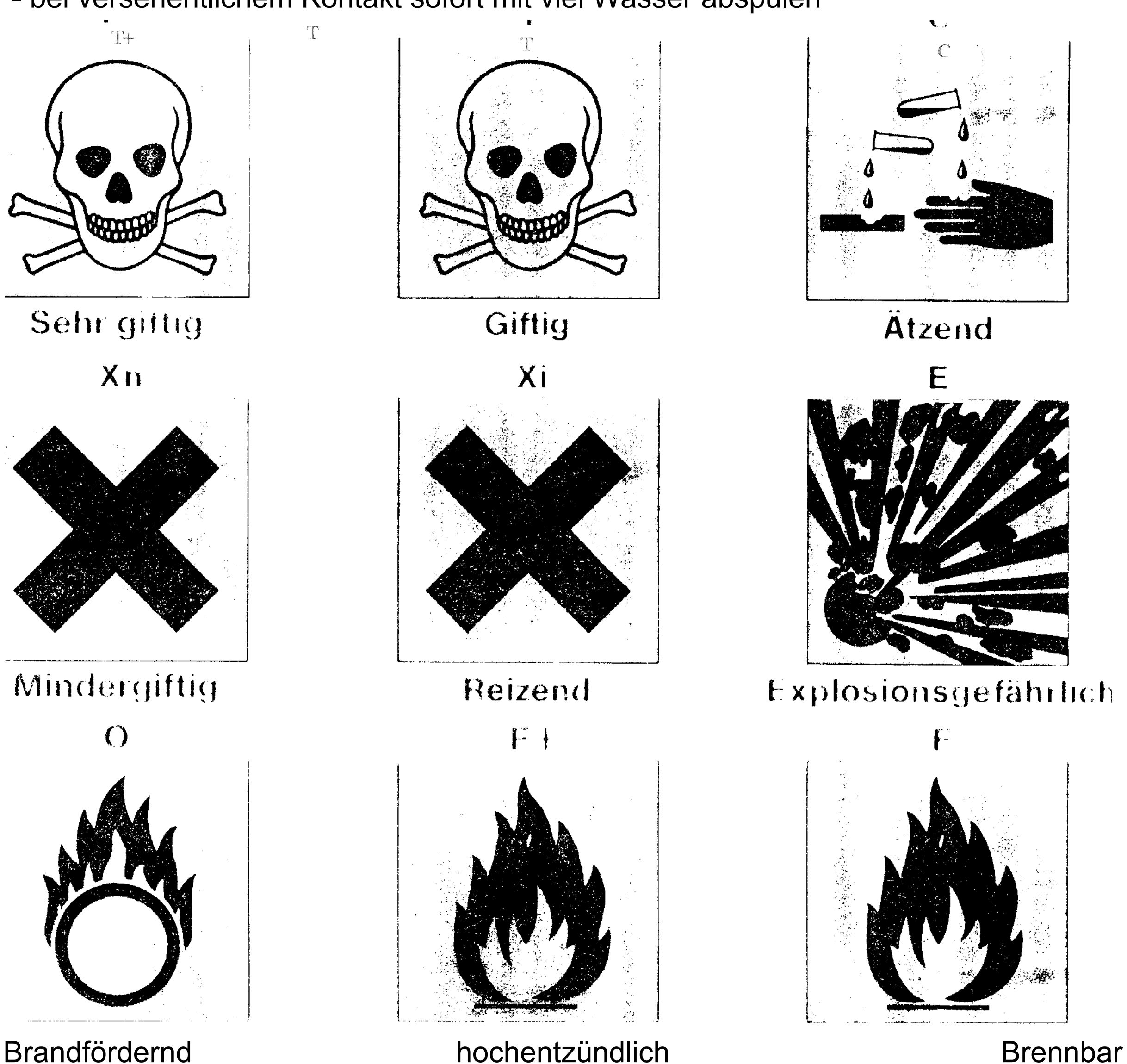
Protokollhinweis:

- Ziel ist, zu jedem Versuch im Vorfeld (vor dem Labortermin) mit Skript und anderen Quellen (z.B. Wikipedia) zu recherchieren, worum es geht, sich dann im Labor Beobachtungen zu notieren, und später dann (nach dem Labortermin) im Protokoll daraus Schlußfolgerungen über die chemischen Abläufe zu ziehen.
- Die Leitfragen sollen Ihnen dabei als roter Faden dienen, es genügt jedoch nicht, sich ausschließlich mit der Beantwortung der Leitfragen zu begnügen – in der Ausarbeitung ihres Laborprotokolls sollte man bei jedem Versuch ersehen können, was beobachtet bzw. gemessen wurde, und welche Bedeutung dies hat, auch bei Versuchen, die nicht durch Leitfragen abgedeckt sind.

0.2 Arbeitssicherheitshinweise

Bei chemischen Untersuchungen müssen häufig gefährliche Stoffe eingesetzt werden. Obwohl für das Praktikum möglichst unbedenkliche Versuche ausgewählt wurden, sind doch die allgemeinen Regeln für den Umgang mit Gefahrstoffen zu beachten.
Zunächst wird auf die Kennzeichnung gefährlicher Stoffe hingewiesen. Grundsätzlich ist jedoch auch beim Umgang mit nicht gekennzeichneten Stoffen Vorsicht geboten, da Kennzeichnungen fehlen und Kenntnisse über die gefährlichen Eigenschaften unvollständig sein können. Daher gelten als elementare Regeln:

- Im Labor nicht essen, trinken oder rauchen
- Schutzkleidung und Schutzbrille tragen
- nicht mit dem Mund pipettieren
- Chemikalien nicht verschütten, Berührung mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden
- bei versehentlichem Kontakt sofort mit viel Wasser abspülen



Brandfördernd hochentzündlich Brennbar

Abbildung 1

1 Versuchstag 1: Physikalische und chemische Grundlagen

1.1 Platz 1: Molekularbewegung

1.1.1 Löslichkeit von hydrophilen und hydrophoben Biomolekülen (Alt. 1.1)

1.1.1.A Versuch: Löslichkeit (VF 2.1, Altskript V1.1)

Die Löslichkeit von Biomolekülen verschiedener Struktur in verschiedenem Milieu ist sowohl für ihre Verteilung in der Zelle wie für ihre Extrahierbarkeit für Experimente und analytische Zwecke von Bedeutung.

Entsorgung der Petroleum-Phasen nur in die vorgesehene Abfallflasche!!!!

Für Olivenöl nur Einmalpipetten verwenden, verschmutzte Pipetten u. Reagenzglas werden nicht gespült, sondern separat entsorgt.

- Prüfen Sie mit kleinen Proben (1 Tr. bzw. ½ kleiner Spatel) der untenstehenden Stoffe ihre Löslichkeit.
- Verwenden Sie Rgl. 14x160 mit je ca. 5ml (4cm hoch) Wasser bzw. Petroleum.
- Geben Sie die jeweils zu prüfende Substanz je einmal in Wasser und einmal in Petroleum.
- Vermerken Sie ihre Beobachtungen in der nachfolgenden Tabelle.
- Überlegen Sie, warum die Substanzen sich in manchen Fällen lösen, in anderen nicht (Stichwort Polarität).
- Recherchieren Sie für Ihr Protokoll die Strukturformeln der Substanzen und interpretieren Sie die Löslichkeiten auf Basis der verschiedenen möglichen inter-molekularen Wechselwirkungen sowie der Enthalpie- und Entropiebeiträge zu ΔG.

Substanz löslich in	**Wasser**	**Petroleum**
Ammoniumsulfat $(NH4)_2SO_4$		
Glucose		
Olivenöl		
Jod		

Tabelle 1

Material: Reagenzglas., Bechergläser 50ml f. Petroleum, Spatel, Pasteurpipetten, Abfallflasche

1.1.1.B Versuch: Emulgatoren (VL 7.2, Altskript V1.2)

- In je 2 Reagenzglas. 16X100 (Schraubverschluß) mit je 5ml H_2O wird je 1Tr. Olivenöl gegeben. Dann setzt man einem Reagenzglas. 1Tr. Spülmittel zu und schüttelt beide Gläser intensiv.
- Notieren Sie ihre Beobachtung vor und nach Zugabe des Spülmittels.
- Welche Eigenschaften hat im Allgemeinen ein Stoff, den man als Emulgator bezeichnet (Stichwort Polarität)?

1.1.2 Diffusion und Dialyse (Altskript 1.2)

1.1.2.C Versuch: Diffusion (VF 2.2a, Altskript V1.4)

Diffusion wird mit farbigen Substanzen sichtbar gemacht:

- Geben Sie in zwei Reagenzgläser gleich hoch (etwa 3 cm) eine gelbe wäßrige Lösung von Methylenblau bzw. die bräunliche Lösung von Hämoglobin in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl).
- *Unterschichten* Sie diese Lösungen mit etwa dem gleichen Volumen einer spezifisch schwereren Glycerin-Wassermischung (Volumenverhältnis ca. 1:1).
- Stellen Sie die Reagenzgläser ohne Erschütterung zur Seite.
- Beobachten Sie über längere Zeit die Änderungen der scharfen Phasengrenze und der Farbe, und notieren Sie die Wanderungsstrecken in Abhängigkeit von der Zeit. Welche Moleküle diffundieren in welche Richtungen und wie schnell?

Materialien: Reagenzglas., Pasteur-Pipetten, Becherglas 50ml

1.1.2.D Versuch: Dialyse (VF2.2b, Altskript V1.5)

Sind zwei mischbare Lösungen nicht durch eine diffuse Grenzschicht, sondern durch eine "semipermeable Membran" getrennt, so kann ein Ausgleich von Konzentrationsunterschieden nur für solche Teilchen erfolgen, die durch die Membran wegen ihrer passenden Größe oder Struktur hindurchdiffundieren können. Dialysieren ist eine wichtige biochemische und medizinische Möglichkeit zum Entfernen kleiner Moleküle aus Lösungen von Makromolekülen, z. B. von Salzen aus Proteinlösungen ("Entsalzen" von Enzympräparationen, Hämodialyse bei Nierenversagen). Synthetische semipermeable Membranen stehen als Folien oder "Dialysierschläuche" in großer Vielfalt zur Verfügung.

- Füllen Sie etwa 6ml einer Mischung von Methylenblau (0,1g/l) und Hämoglobin (10mg/ml) in 0,9% NaCl-Lösung in einen vorgequollenen Dialyseschlauch, binden knapp über dem Flüssigkeitsstand oben ab (Luftblase lassen) und tauchen ihn in ein wassergefülltes Becherglas auf dem Magnetrührer.
- Beobachten Die die im Verlauf einiger Stunden eintretende Änderung im Dialysat (=äußere Lösung) und im Dialysierschlauch (Retentat).
- Begründen Sie in Ihrem Protokoll, aus welcher Art von Stoffen (erforderliche Eigenschaften) der Schlauch besteht und warum er quillt.

Materialien: Klammern, Rührfisch

1.1.3 Grundlagen der Chromatographie (Altskript 1.3)

- Recherchieren Sie, was im Allgemeinen als Chromatographie bezeichnet wird und warum diese so genannt wird (Stichwort Bande).

1.1.3.E Versuch: Adsorption (VL 157.1, Altskript V1.6)

- Unter dem ***Abzug*** werden in einen 250ml-Erlenmeyerkolben mit Stopfen einige Spatelspitzen gekörnte Aktivkohle gegeben.
- Dann werden unter dem *Abzug* **unter Aufsicht** zusätzlich einige Tropfen Brom zugegeben (Pasteur-Pipette, Handschuh, Vorsicht! – leicht flüchtig und giftig, NICHT einatmen). Verschließen sie das Gefäß gründlich, und schütteln Sie es dann einige Male.
- *Entsorgung nur im Abzug!*
- Notieren und begründen sie ihre Beobachtung.
- Recherchieren Sie, wo in der Medizin u.a. Aktivkohle eingesetzt wird.

1.1.3.F Versuch: Verteilung (VL 157.2, Altskript V1.7)

Anmerkung: Dieser Versuch wird aus Zeitgründen nicht praktisch durchgeführt, sondern nur theoretisch betrachtet (siehe auch Vorlesung).

- Eine wäßrige Jod-Kaliumiodidlösung (30ml 0,05M) wird in einem Scheidetrichter mit dem gleichen Volumen Dichlormethan ausgeschüttelt (Handschuhe).
- Nach dem Einfüllen Stopfen aufsetzen, umdrehen und über den Hahn mehrfach Druckausgleich durchführen, dabei Hahnkücken und Stopfen festhalten!
- Die Dichlormethanphase läßt man ablaufen und wiederholt den Vorgang mehrere Male.
- Überlegen Sie, was zu beobachten wäre und welche Stoffe dabei entstünden.

Materialien: Bechergläser 50ml, 100ml.

1.2 Platz 2: Chemische Reaktionen mit Ladungsübertragung

1.2.1 Säuren, Basen und Puffer (Altskript 1.4)

Die "Stärke" oder "Schwäche" einer Säure oder Base hängt von deren Molekülstruktur ab. In Dicarbonsäuren (z.B. Bernsteinsäure) ist die erste COOH-Gruppe stärker, die zweite schwächer sauer als in einer Referenz-Monocarbonsäure (z.B. Essigsäure).

- Recherchieren Sie für Protokoll, was man unter dem pH-Wert versteht. Erklären Sie in Worten, was „ $pH = -lg[H_3O^+]$ “ bedeutet.
- Recherchieren Sie für Ihr Protokoll, was der K_s- bzw. K_b-Wert und der pK_s- bzw. pK_b-Wert (engl. pK_a / pK_b) bedeuten.

Allgemeine Formeln zu Erinnerung und Herleitung:
Eckige Klammern sind eine Kurzschreibweise für Konzentration von c ( )

Dissoziationgleichungen:

Säure: $HA + H_2O \leftrightarrows A^- + H_3O^+$; beachte: $H_3O^+ \leftrightarrows H^+ + H_2O$

Dabei ist HA die Säure und A^- die konjugierte (zugehörige) Base (=Säurerest)

Base: $B + H_2O \leftrightarrows BH^+ + OH^-$

Dabei ist B ist die Base und BH^+ ihre konjugierte Säure

$pH = -log[H_3O^+]$; $pOH = -log[OH^-]$

Für Säure- / Basenpaare gilt dabei: pH + pOH = 14

- pH-Wert für starke Säuren (dissoziiert vollständig): $pH = -log(c_0(Säure))$
- pH-Wert für schwache Säuren (teilw. dissoziiert): $pH = ½ (pK_s – log(c_0(Säure))$
- pH-Wert einer Lösung des Salzes eine schwachen Säure:
- $pH = ½ (14 + pK_s + log(c_0 (Säurerest))$
- Puffergleichung: $pH = pK_s + \log\frac{[result.Base]}{[Säure]}$
- Stellen Sie folgende Überlegung im Allgemeinen an und wenden Sie diese später auf die Aufgabenstellung des nachfolgenden Versuches an:
  x = a+b ; y = a/b ; x und y sind bekannt, gesucht sind a und b
- Berechnen Sie im Vorfeld für Ihr Protokoll, welche Menge an Trockensubstanz in destilliertem Wasser gelöst werden muß, um eine im Versuch gegebene Konzentration zu erreichen. Beachte:

  Die Konzentration ist in M gegeben, das bedeutet in mol/l
  Die Angabe für einen Puffer bezieht sich auf die Gesamtkonzentrationen von Säure und konjugierter Base (meist Säurerest).
  Die molare Masse der Trockensubstanz ist auf ihrem Behälter in g/mol gegeben.
  Das zu mischende Volumen ist im Versuch unten in Millilitern gegeben.
  Welche Trockenmasse (in Gramm) benötigen Sie für Ihr Volumen?
  Recherchieren Sie für Ihr Protokoll die chemische Struktur der verwendeten Substanzen.

1.2.1.G Versuch: Pufferlösungen (VF 2.3, Altskript V1.8)

- Stellen Sie eine der unter a) - d) spezifizierten Pufferlösungen her. Jede Gruppe stellt dabei nur eine der Lösungen her.
- Kalibrieren Sie das pH-Meter mit Maßlösung (Zweipunkt-Kalibrierung, erst pH 7, dann pH 4). Spülen Sie den Prüfkopf des pH-Meters (Vorsicht! Sehr zerbrechlich!) vor und nach Gebrauch gründlich mit destilliertem Wasser! Achten Sie darauf, den Prüfkopf des pH-Meters in ein Reagenzglas mit destilliertem Wasser abzustellen, wenn er nicht in Gebrauch ist. Vermeiden Sie Verunreinigung und Austrocknung des Prüfkopfes.
- Überprüfen Sie den pH-Wert der von ihnen hergestellten Lösung mit Hilfe des von Ihnen kalibrierten pH-Meters.
- Stellen Sie mit Säure oder Lauge den gewünschten pH-Wert ein, messen und dokumentieren Sie die dafür erforderliche Menge. Warum muß in der Praxis fast immer korrigiert werden?

Pufferlösungen (je eine pro Gruppe):
a) 200ml 125 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5
b) 200ml 0,5 M Tris-HCI-Puffer pH 7,8
c) 250ml 100 mM K-Citratpuffer pH 5,0 aus Zitronensäure
d) 100ml 0,25 M Citratpuffer pH 6,5 aus Trinatriumcitrat

Substanz	Dissoziationsgleichgewicht	pK_s-Werte		
Phosphorsäure	$H_3PO_4 \leftrightarrows H^+ + H_2PO_4^-$	2,0	7,2	12,3
Zitronensäure	$C_3H_5(COOH)_3 \leftrightarrows 3H^+ + C_3H_5O(COO^-)_3$	3,1	4,8	6,4
Tris (Tris-hydroxymethl-aminomethan)	$C_4H_{12}NO_3^+ \leftrightarrows C_4H_{11}NO_3 + H^+$	8,3		

Tabelle 2

- Suchen sie den zu ihrer Lösung passenden pK_s-Wert aus der Tabelle aus. Überlegen Sie, welcher pK_s-Wert bei Säuren mit mehreren Dissoziationsstufen konkret gilt (Hinweis: Abhängigkeit vom pH-Wert). Achtung, Tris ist eine Base!
- Treffen Sie eine Aussage über das Verhältnis von Salzkonzentration zu Säurekonzentration, indem Sie ihre pH- und pK_s-Werte in die Puffergleichung einsetzen.
- Überlegen Sie, welcher Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Salz, Säure und Puffer besteht.
- Berechnen Sie für Ihr Protokoll die Konzentration von Salz und Säure.

Mat.: Bechergläser, Flaschen, pH-Meter.

1.2.2 Redoxvorgänge (Altskript 1.5)

Reduktion: Aufnahme von Elektronen (bed. praktisch oft Aufnahme von Wasserstoff)
Oxidation: Abgabe von Elektronen (bed. praktisch oft Aufnahme von Sauerstoff)
Reduktionsmittel: Elektronendonator (oft elementarer Wasserstoff)
Oxidationsmittel: Elektronenakzeptor (oft Sauerstoff)

1.2.2.H Versuch: Elektrochemische Redoxreaktion (VL 91.2, Altskript V 1.9)

- Stellen Sie 20 ml 1%iger Stärkelösung bereit, heben Sie diese auf.
- Füllen Sie den Mittelteil eines Doppel-U-Rohres bis zur Markierung mit Kaliumchloridlösung (KCl, 1M).
- Stellen Sie Kaliumjodidlösung 0,1M her, setzen Sie ihr einige Tr. 1%ige Stärkelösung zu.
- Füllen Sie den ersten Schenkel des Doppel-U-Rohres mit der stärkeversetzten Kaliumjodidlösung.
- Setzen Sie unter dem Abzug gesättigte Bromwasserlösung an.
- Füllen Sie den zweiten Schenkel des Doppel-U-Rohres mit dem gesättigten Bromwasser.
- Tauchen sie je eine Platinelektrode in jeden der beiden Schenkel des Doppel-U-Rohres ein.
- Verbinden Sie die beiden Elektroden mit ihrem jeweiligen elektrischen Meßgerät.
- Messen Sie mit dem Voltmeter die Spannung zwischen den beiden Elektroden.
- Messen Sie mit dem Amperemeter den Stromfluß zwischen den beiden Elektroden.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll diese beiden Meßwerte.
- **Entsorgung muß im Abzug erfolgen!**
- Recherchieren Sie für Ihr Protokoll die Begriffe Kathode, Anode, inerte Elektrode, Überspannung und Redox-Reaktion.
- Ermitteln Sie daraus, was hier die Kathode bzw. die Anode ist, welche Reaktion dort jeweils stattfindet und welche Gesamt-Redox-Reaktion stattfindet.

1.2.2.I Versuch: Methylenblau-Leukomethylenblau (VF 2.8, Altskript V 1.10)

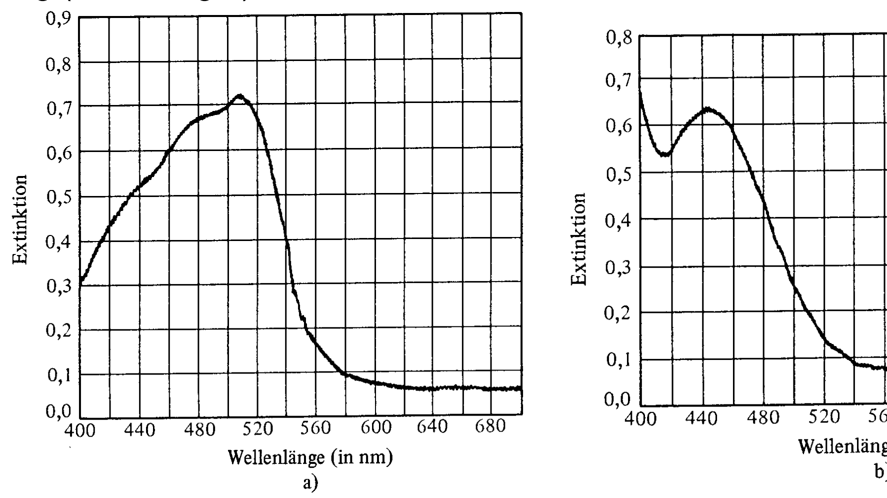
„Das blaue Wunder“:

- Lösen Sie in einer Flasche mit Stopfen 5g Glucose in ca. 150ml NaOH, 1M.
- Geben Sie dazu ca. 1ml Methylenblau-Lösung (0,1% in Wasser).
- Beobachten Sie die Reaktionsmischung. Der Farbwechsel ist reversibel. Ist sie farblos geworden, so schütteln Sie kräftig und lassen wiederum stehen.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll, wie oft Sie den Farbwechsel wiederholen können. Welche Stoffe dienen als Reduktions- bzw. als Oxidationsmittel?
- (Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser bei 20°C ca. 10mg/l)

1.3 *Platz 3: Spektroskopie/Photometrie*

1.3.1 Spektrale Eigenschaften, Absorptionsspektrum und Farbe von Molekülen

Jede Substanz absorbiert und reflektiert Licht bestimmter Wellenlängen stärker oder schwächer. Die Farbe eines Stoffes hängt von der Wellenlänge des absorbierten Lichts ab. Wenn ein Stoff mit weißem Licht (polychromatischem Licht, Licht aller Farben) ausgesetzt wird, so werden bestimmte Wellenlängen absorbiert, die übrigen erreichen das Auge. Welche Farbe das Auge wahrnimmt, hängt nur von den transmittierten (nicht absorbierten) Wellenlängen ab. Anders gesagt: der Beobachter sieht die Komplementärfarbe(n) der absorbierten Farbe(n). Wenn mehr als eine Farbe durchgelassen wird, bestimmt die jeweilige Empfindlichkeit des Auges, welche Farbe oder welche Farben wahrgenommen werden. So absorbiert z.B. die Chromat-Lösung (Abbildung 2) blaues und violettes Licht und erscheint dem Auge gelb.



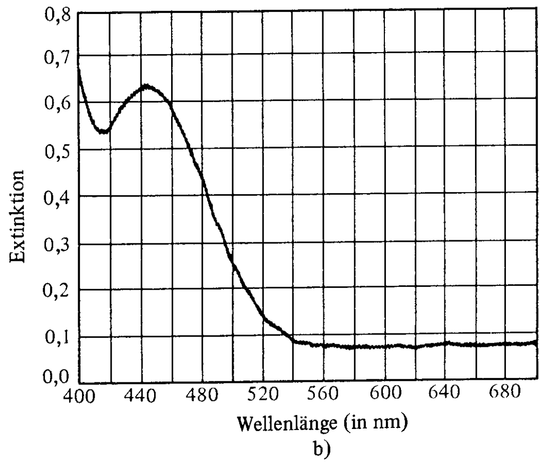


Abbildung 2: Lichtabsorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts.
a) Spektrum des Eisen-Phenanthrolin-Komplexes (rot) b)Spektrum von Kaliumchromat (gelb)

Absorptionsspektren

Bei der photometrischen Analyse wird die Probenlösung idealerweise mit monochromatischem Licht - das ist Licht einer einzigen Wellenlänge - (in der Praxis: mit Licht eines schmalen Wellenlängenbereiches von wenigen nm) bestrahlt, und die Absorption bei jeder der verschiedenen Wellenlängen wird gemessen. Durch Auftragen der Absorption, der prozentualen Transparenz (**Transmission**) oder der **Extinktion (Absorbanz, engl. Absorbance)** gegen die Wellenlänge erhält man ein *Spektrum*. Für die Messungen wird ein Spektralphotometer verwendet. Die Absorptionsspektren von zwei Verbindungen, die sichtbares Licht absorbieren, sind in Abbildung 2 dargestellt. Für die quantitative Analyse verwendet man eine Wellenlänge, bei der die zu bestimmende Substanz selbst stark absorbiert und die Absorption anderer Verbindungen vernachlässigbar ist. Bei einer jeden Wellenlänge eines Spektrums wird die Extinktion einer Lösung von zwei Faktoren bestimmt. Zum einen ist dies die Konzentration der absorbierenden Substanz in Lösung - je höher die Konzentration, desto größer die Extinktion (Einige chemische Verbindungen absorbieren bei gleicher Stoffmengenkonzentration mehr Licht als andere; dies bedeutet eine für jede einzelne Verbindung charakteristische Proportionalität zwischen Extinktion und Konzentration). Der andere Faktor ist die Dicke der absorbierenden Schicht - je dicker die absorbierende Schicht (je länger der Strahlengang durch die Lösung), um so größer ist die Extinktion.

Das Lambert-Beersche Gesetz

Aus der Diskussion im vorangegangenen Abschnitt kann intuitiv entnommen werden, daß die Menge des durch eine Spezies in Lösung absorbierten Lichtes von der Anzahl der Ionen oder Moleküle dieser Spezies im Strahlengang des Photonenstrahls abhängt. Hieraus folgt, daß mehr Licht absorbiert wird, wenn die Konzentration der absorbierenden Spezies steigt. Analog werden um so mehr Photonen absorbiert, je länger der Lichtweg des Photonenstrahls durch die Lösung ist. Der dritte Faktor, der die Menge des absorbierten Lichts bestimmt, ist die Wahrscheinlichkeit, daß ein Photon absorbiert wird und einen Elektronenübergang in einer chemischen Verbindung verursacht. Verschiedene chemische Verbindungen haben unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für Elektronenübergänge; die Verbindung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit absorbiert mehr Licht als andere Verbindungen bei der gleichen Konzentration.

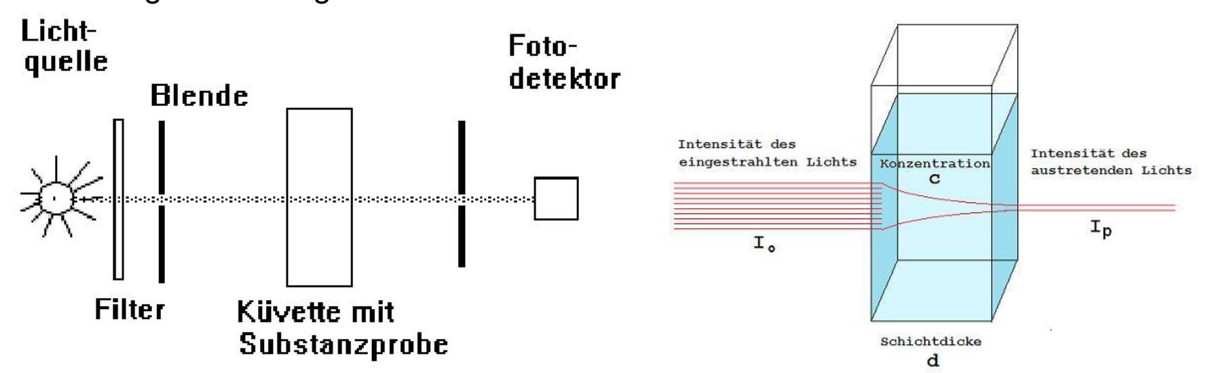


Abbildung 3: Schema einer Meßzelle mit einer Lösung, die Photonen (hf) absorbiert.

Um diese Aussagen in mathematischer Form auszudrücken, wollen wir einen Photonenstrahl einer einzigen Wellenlänge betrachten, der eine Lösung durchläuft. Wir wollen die Anzahl der die Zelle pro Sekunde passierenden Photonen als I_0 bezeichnen, die Intensität des Lichtstrahls vor der Probe (einfallende Lichtintensität). Eine bestimmte Anzahl von Photonen wird absorbiert und eine dadurch festgelegte Anzahl passiert die Zelle und fällt auf den Detektor. Die Anzahl der pro Sekunde auf den Detektor auftretenden Photonen wollen wir mit I_P bezeichnen; sie steht für die transmittlerte Strahlungsintensität, für die Intensität hinter dem Absorber.

Transmission, prozentuale Transmission und Extinktion

Wir definieren die *Transparenz* bzw. *Transmission* (Durchlässigkeit)

(1) $T = I_P / I_0$ bzw. $\%T = 100*T$

Die zugehörige (negative) logarithmische Größe (Exponentialwert) bezeichnet man als *Extinktion* oder Absorbanz (engl. *Absorbance*):

(2) $E = - \lg T$ bzw. $E = 2 – \lg(\%T)$

Welche Wertebereiche können Extinktion und Transmission nun annehmen? Wenn eine Lösung praktisch kein Licht absorbiert, wird $I_P=I_O$ und somit [mit Gl. (1)] T = 1 bzw. % T = 100. Bei einer stark absorbierenden Lösung dagegen ist $I_P = 0$, folglich ist die Transparenz und auch die prozentuale Durchlässigkeit praktisch gleich 0. Damit reicht T von 0 bis 1 und % T von 0 bis 100. Die gleiche Betrachtung zeigt, daß die Extinktion von 0 bis unendlich reicht, obwohl in der Praxis eine Extinktion größer als 2 oder 3 nur mit Schwierigkeiten und geringer Genauigkeit und Präzision gemessen werden kann.

Auf einem Spektralphotometer mit analoger Skala ist die Transmissionsskala linear und die Extinktionsskala logarithmisch angeordnet.
Das Grundgesetz der Spektralphotometrie, bekannt als das *Lambert-Beersche Gesetz*, kann nun angegeben werden:

(3) $E(\lambda) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$

In dieser Gleichung ist ε_λ der Extinktionskoeffizient, eine für jede chemische Verbindung bei einer bestimmten Wellenlänge charakteristische Konstante; d ist die Weglänge des Lichtes durch die Lösung in cm (Abbildung 3); und c ist die Konzentration an absorbierender Spezies in der Lösung. Der Extinktionskoeffizient a ist charakteristisch für eine bestimmte absorbierende Spezies bei einer bestimmten Wellenlänge; er verändert sich, wenn die Wellenlänge verändert wird. Mit anderen Worten, das Lambert-Beersche Gesetz kann nur auf *monochromatische* Strahlung angewendet werden. Der numerische Wert des Extinktionskoeffizienten hängt von den Einheiten ab, in denen die Konzentration der absorbierten Lösung angegeben ist.
Man erhält also eine Gerade mit positiver Steigung, wenn man den negativen Logarithmus der Transmission gegen die Stoffmengenkonzentration aufträgt.

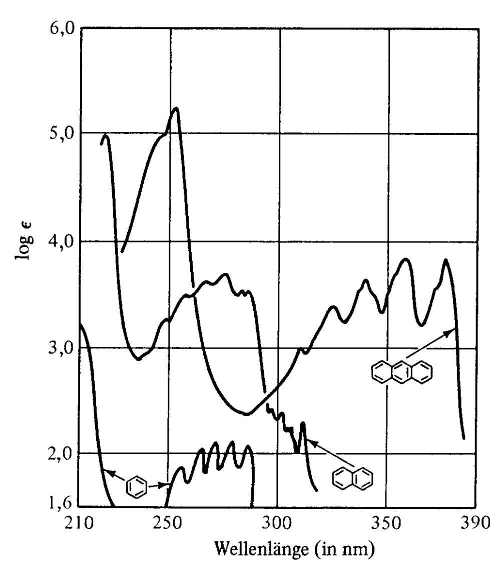
Der molare dekadische Extinktionskoeffizient

Gibt man die Konzentration der Lösung als Stoffmengenkonzentration (mol/l) an, so wird das Lambert-Beersche Gesetz in der Form.

(3a) $E(\lambda) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$

geschrieben, wobei ε der molare dekadische Extinktionskoeffizient ist. Dieser ist wie ε_λ charakteristisch für eine bestimmte chemische Spezies bei einer vorgegebenen Wellenlänge; häufig wird er für die Wellenlänge der maximalen Extinktion angegeben. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient hat üblicherweise die Einheit $l/_{mol \cdot cm}$. Da die Gl. (3a) die bevorzugte Form des Gesetzes ist, wird in wissenschaftlichen Zeitschriften stets der molare dekadische Extinktionskoeffizient als Kenngröße von Stoffen. angegeben.

Wenn eine Messung durchgeführt werden soll, wird das Spektralphotometer zunächst so justiert, daß die Skala "prozentuale Transmission (% T) in Abwesenheit von Strahlung aus der Strahlungsquelle 0 anzeigt, sowie 100 für eine reine Lösungsmittelprobe bei der für die spätere Probenmessung verwendeten Wellenlänge. Für diese Referenzmessung (Blindwert) ist also I_o = 100 %.
Anschließend wird die Probenlösung in den Strahlengang gebracht und gemessen.
Die Skala für die prozentuale Transparenz gibt dann I_P an.
In einigen Fällen absorbieren auch zugesetzte Reagenzien in gewissem Maße. Dann wird zur Bestimmung des Blindwertes die reine Reagenzlösung verwendet und so die durch die Reagenzien verursachte Absorption kompensiert (Abbildung 4).



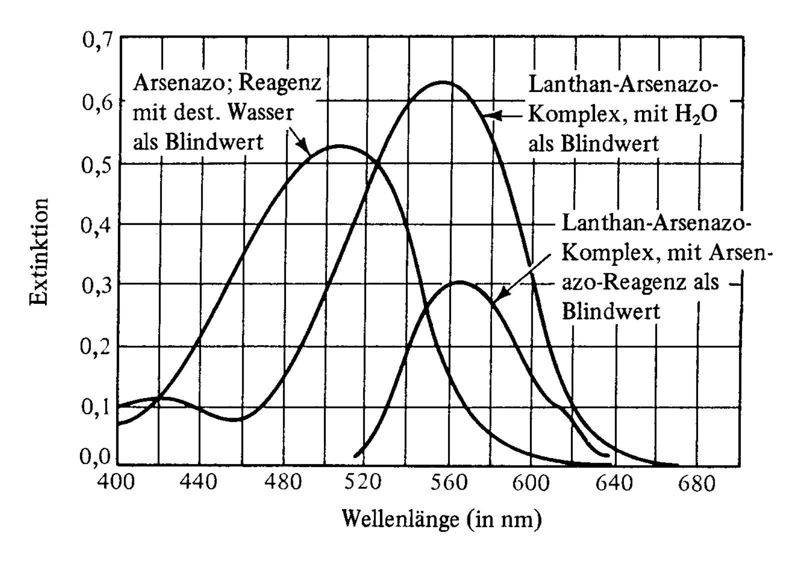


Abbildung 4: Links: Die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten verschiedener chemischer Verbindungen können bis etwa $10^5 \cdot l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ für eine einzelne absorbierende Gruppe in einem Molekül oder ein Ion betragen; Rechts: Probe, Referenz, Differenzspektrum

Zusammenfassung:

- Jede Substanz absorbiert und reflektiert Licht bestimmter Wellenlängen stärker oder schwächer, dies führt unter anderem zur Farbgebung einer Substanz.
- Ein Photometer kann auf Licht bestimmter Wellenlänge λ eingestellt werden, es kann auch viele Wellenlängen nacheinander durchlaufen.
- Im Photometer wird Licht mit der gewünschten Wellenlänge durch eine Probe in einem transparenten Probenbehälter (sog. Küvette) gesendet.
- Dabei wird gemessen, wieviel von dem gesendeten Licht die Probe mit der zu untersuchenden Substanz durchdringt im Vergleich zu einer Referenzprobe ohne die zu untersuchende Substanz
  (Transmission T in %, Referenz hier: destilliertes Wasser).
- 100% minus Transmission = Absorption
- Dargestellt wird wegen der linearen Abhängigkeit von der Konzentration (Lambert-Beersches Gesetz) meist aber die logarithmische Größe, die Extinktion E (engl. Absorbance A, nicht zu verwechseln mit Absorption;
  in Literatur kommt es gelegentlich zu eben dieser Verwechslung):
- Extinktion E = **-** log T   (in der Biologie auch OD = optical density genannt)
- Für monochromatisches Licht gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

  $$E_\lambda = -\log(T) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

  dabei ist d die Dicke der Küvette (i.d.R. 1 cm), c die Konzentration,
  ε_λ der Extinktionskoeffizient der zu untersuchenden Substanz
  für eine bestimmte Wellenlänge λ, ε_λ ist also eine Stoffeigenschaft.
- Wenn sie die Extinktion gemessen haben und die Küvettendicke kennen, können Sie also entweder bei bekannter Konzentration den Extinktionskoeffizienten bestimmen, oder bei bekanntem Extinktionskoeffizienten die Konzentration.
- Informieren Sie sich über die Wellenlängen von Licht und dessen Farben im für das menschliche Auge sichtbaren Bereich.
- Beachten Sie, daß nicht jede Küvette für jede Wellenlänge geeignet ist (verbreitet sind verschiedene Kunststoffe, Glas- bzw. Quarzarten).

1.3.1.J Versuch: Spektren der Nicotinamidnucleotide (VF 2.11, Altskript V 1.11)

- Die Häufigkeit der Nicotinamidnucleotid-Koenzyme in der gesamten Biochemie und die charakteristischen spektralen Eigenschaften machen sie zu einem der im Labor am häufigsten analysierten Systeme.
- Die oxidierte bzw. reduzierte Form NAD^+ bzw. NADH unterscheiden sich sehr charakteristisch im UV-Spektrum.
- Die oxidierte Form zeigt nur die typische Absorption bei 260 nm.
- Dagegen hat NADH eine starke Lichtabsorption bei 340 nm (Abbildung 5).

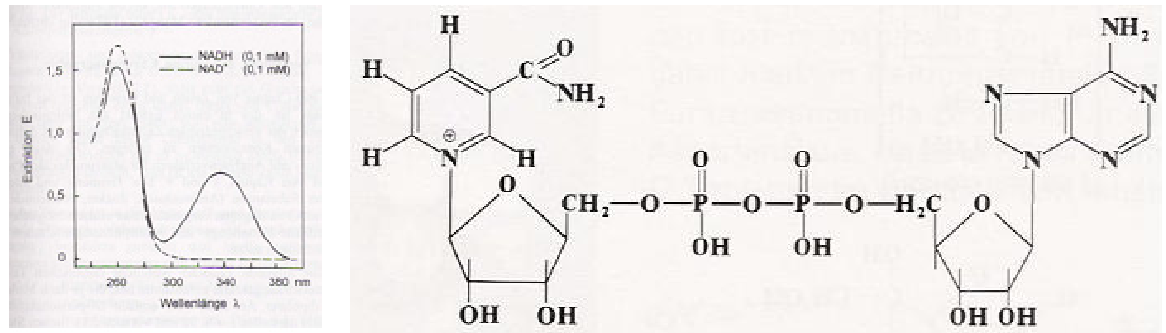


Abbildung 5: Absorptionsspektren 0,1 millimolarer Lösungen von NAD+ und NADH

Aufgabe:

- Nehmen Sie die Spektren von NADH und NAD^+ auf und prägen sie sich ein.
- Da Sie eine NADH-Lösung bekannter Konzentration erhalten, können Sie aus der gemessenen Extinktion bei λ_{max} = 340nm nach Lambert-Beer den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ε_{340} berechnen.

Durchführung:

- Machen Sie sich mit den zu verwendenden Kolbenpipetten vertraut (Stichwort erster bzw. zweiter Druckpunkt) und stellen Sie sicher, daß diese einwandfrei funktionieren. Überprüfen Sie die korrekte Handhabung, indem Sie ein dosiertes Volumen Wasser nachwiegen, z.B. 1 ml entspr. 1g).
- Stellen Sie aus einer 10 ml NADH-Stamm-Lösung bekannter Konzentration (10 mM) bereit. Stellen Sie aus der Stammlösung dann in 10 ml destilliertem Wasser ein Verdünnung von ca. 0,1 mM her. Um welchen Faktor müssen sie verdünnen? Wie geht das einfach und materialsparend?
- Füllen Sie eine Quarzküvette mit destilliertem Wasser (Referenz).
- Stellen Sie den Wellenlängenbereich des Spektroskops auf 400 bis 230 nm ein.
- Führen Sie mit der Referenz einen Nullabgleich (100%T) durch.
- Messen Sie dann für das komplette NADH-Spektrum die Transmission T.
  (Das Gerät verfügt zwar auch über eine Funktion, die Extinktion E direkt zu messen, diese sollen Sie aber zur Übung im Rahmen der Protokollausarbeitung später selbst aus der Transmission T ermitteln, z.B. mittels Tabellenkalkulation.)
- Berechnen Sie für Ihr Protokoll die Koeffizienten ε bei den gemessenen Absorptionsmaxima und vergleichen Sie das Ergebnis mit den Literaturwerten.
- Stellen Sie in ihrem Protokoll jeweils für NAD^+ und NADH graphisch Transmission, Extinktion und Extinktionskoeffizient dar (sinnvolle Skalierung!).
- Achten Sie dabei besonders auf die Wellenlängen der Absorptionsmaxima.

1.3.1.K Versuch: Spektren von Hämoglobinspezies (Altskript V1.12)

Hämoglobin hat in der reduzierten Form sowie mit Bindung an Sauerstoff oder Kohlenmonoxid jeweils verschiedene spektrale Eigenschaften.
Messen Sie diese in folgender Weise:

Durchführung:

- Machen Sie sich mit den zu verwendenden Kolbenpipetten vertraut (Stichwort erster bzw. zweiter Druckpunkt) und stellen Sie sicher, daß diese einwandfrei funktionieren. Überprüfen Sie die korrekte Handhabung, indem Sie ein dosiertes Volumen Wasser nachwiegen, z.B. 1 ml entspr. 1g).
- Füllen Sie eine Kunststoffküvette mit destilliertem Wasser (Referenz).
- Stellen Sie den Wellenlängenbereich des Spektroskops auf 400 bis 800 nm ein.
- Führen Sie mit der Referenz einen Nullabgleich (100%T) durch.
- 100µl heparinisiertes (nichtgerinnendes) Blut werden in 10ml 0,5% $NaHCO_3$ pipettiert.
- Geben sie die Hämoglobinlösung in eine Küvette und verschließen Sie diese mit dem Küvettendeckel oder mit Parafilm.
- Messen Sie dann für das komplette Hb-Spektrum die Transmission T.
- Das Gerät verfügt zwar auch über eine Funktion, die Extinktion E direkt zu messen, diese sollen Sie aber im zur Übung Rahmen der Protokollausarbeitung später selbst aus der Transmission T ermitteln, z.B. mittels Tabellenkalkulation.
- **Die Küvette nicht entleeren, sondern für 2. Messung (s.u.) aufbewahren.**
- Berechnen Sie für Ihr Protokoll die Koeffizienten ε bei den gemessenen Absorptionsmaxima und vergleichen Sie das Ergebnis mit den Literaturwerten.

Messung des reduzierten Hb:

- Reduzieren Sie das Oxyhämoglobin durch Zugabe von einigen Kristallen $Na_2S_2O_4$
- Messen Sie erneut jeweils das Spektrum im Bereich 400-800nm und werten Sie es aus.
- Stellen Sie in ihrem Protokoll jeweils für oxygeniertes und desoxygeniertes Hb graphisch Transmission, Extinktion und Extinktionskoeffizient dar.
- Achten Sie dabei besonders auf die Wellenlängen der Absorptionsmaxima.
- Recherchieren Sie zur Berechnung des Extinkionskoeffizienten die molare Masse von Hämoglobin aus Literatur (bzw. akzeptablen Internetquellen wie z.B. Wikipedia). Gehen Sie dabei von sauerstoffgesätigtem Hämoglobin aus und rechnen Sie in Dalton gegebene Massen zunächst in Gramm um. Vernachlässigen Sie dabei das Vorhandensein des Natriumhydrogencarbonats bzw. die Natriumdithionits.

1.4 Platz 4: Einführung einfache Biomoleküle

1.4.1 Fette und Lipide (Altskript V 2.1)

1.4.1.L Versuch: Baeyer-Probe (VL 7.4, Altskript V 2.1)

- Geben Sie fünf Tr. Olivenöl in ca. 5ml Na_2CO_3 (w=5%)
- Erwärmen Sie dieses Gemisch
- Schütteln Sie dann dieses Gemisch kräftig, um es so zu emulgieren.
- Fügen Sie unter weiterem Schütteln tropfenweise stark verd. Lösung von $KMnO_4$ solange zu, bis die Violettfärbung erhalten bleibt.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtung.
- Auf welche Eigenschaften von $KMnO_4$ läßt sich schließen?

Mat.: Erlenmeyer 50ml, Wasserbad.

1.4.1.M Versuch: Verseifung von Fett (VL 10.1, AltskriptV 2.2)

- In einem 100ml-Erlenmeyerkolben werden ca. 6ml Olivenöl, ca. 20ml KOH (w=30%), ca. 60ml Ethanol (als Lösungsvermittler) und einige Siedesteinchen gemischt. **Vorsicht**, Kalilauge ist stark ätzend! Schutzbrille oder Gesichtsschirm!
- Erwärmen Sie das Gemisch ca. 20min im kochenden Wasserbad.
- Geben Sie ca. 2 ml des Gemisches in ein Reagenzglas mit Schraubdeckel.
- Lassen Sie dieses abkühlen.
- Versetzen Sie das abgekühlte Gemisch mit ca. 5ml H_2O.
- Verschließen Sie den Schraubdeckel fest und schütteln Sie das Gemisch kräftig, so daß es zu Seifenschaumbildung kommt.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtung.
- Auf was für eine Reaktion können Sie daraus schließen?

1.4.1.N Versuch: „Kalkseife" (VL 11.1, Altskript V 2.3)

- Geben Sie ca.3ml der Gemisches (aus 1.4.1.M) in ein weiteres Reagenzglas mit Schraubdeckel.
- Geben Sie ca. 7ml $CaCl_2$ (w=5%) zu.
- Verschließen Sie den Schraubdeckel fest und schütteln Sie das Gemisch kräftig.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtung.
- Auf was für eine Reaktion können Sie daraus schließen?

1.4.1.O Versuch: Fettsäuren (VL 11.2, Altskript V 2.4)

- Geben Sie 2ml der Reaktionsmischung (aus 1.4.1.M) und 2ml HCl in ein weiteres Reagenzglas mit Schraubdeckel.
- Verschließen Sie dieses fest und schütteln sie es (freie Fettsäuren fallen aus).
- Lösen Sie den Niederschlag wieder durch Zugabe von 3ml Trichlorethan und kräftiges Schütteln.
- Notieren Sie Ihre Beobachtungen für Ihr Protokoll.
- Warum sind freie Fettsäuren in Wasser schwerlöslich, in Trichlorethan löslich? Vorsicht: Trichlorethan muß in einen gesonderten Abfallbehälter.
- Notieren Sie nach Ablauf von 10 min erneut Ihre Beobachtungen für Ihr Protokoll.

1.4.2 Kohlehydrate und verwandte Verbindungen Teil I (Altskript 2.2)

1.4.2.P Versuch: Fructose und Glucose (VL19.1/4, Altskript V 2.6)

- Geben Sie in ein Reagenzglas (16x100, Schraubdeckel) ca. 5ml Fructose-Lösung (w=1%)
- Prüfen Sie diese mit einem Glucoseteststreifen (GOD-Test).
- Geben Sie 50µL NaOH (1M) zu.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtungen.
- Erhitzen Sie kurz auf 100°C (Heizblock).
- Neutralisieren Sie die Natronlauge durch Zugabe von 50µL HCl (1M) und geben Sie als Puffersubstanz noch ca. 200mg (2 kl. Löffelspatel) $NaHCO_3$ zu
- Lassen Sie die Lösung abkühlen.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welchen Zweck das Neutralisieren und Abkühlen hat.
- Führen Sie erneut einen Test durch.
- Notieren Sie erneut für Ihr Protokoll Ihre Beobachtungen.

1.4.2.Q Versuch: Glucosebestimmung mit Glucoseoxidase / GOD-NAD-Test (VF 5.2, Altskript V 2.9 bzw. 2.7)

Die Analytik von Zuckern beruht heute überwiegend auf ihrer Umsetzung mit spezifischen Enzymen. Solche Enzyme sind in großer Vielzahl kommerziell erhältlich, weil die Bestimmung von Zuckern in Lebensmitteln und Getränken eine häufige praktische Aufgabe ist (z.B. in der Lebensmittelchemie). Die primären Umsetzungen der verschiedenen Substrate (Zucker) müssen meist mit (physiologischen oder nichtphysiologischen) Farbreaktionen gekoppelt werden, um eine Detektion der farblosen Substrate und/oder Produkte zu erreichen.

Aufgabe:

- Bestimmen Sie Glucose enzymatisch mit Merck Reflectoquant Glucose-Test Nr. 1.16720 (Meßbereich 1-100mg/l):
- Verdünnen Sie die Glucoselösung (aus 1.4.2.P) entsprechend dem Meßbereich, so daß Sie sich im oberen Drittel des Meßbereiches bewegen.
  Der pH-Wert muß zwischen 2 und 10 liegen.
  Neutralisieren Sie die Proben ggf. mit $NaHCO_3$.
- Stellen Sie am Reflektometer Methode 511 ein, Meßablauf A
  (s.a. Bedienungsanleitung).
- Entnehmen Sie 1 Analysenstäbchen, verschließen Sie das Röhrchen sofort wieder.
- Tauchen Sie das Teststäbchen in Probe ein, so daß beide Reaktionszonen vollständig benetzt werden, drücken Sie gleichzeitig die START-Taste.
- Nehmen Sie nach 15s das Stäbchen aus der Lösung.
- Schütteln Sie überschüssige Flüssigkeit kräftig ab.
- Wenn das akustische Signal ertönt, drücken Sie den Stäbchenadapter nach rechts und führen das Stäbchen mit den Reaktionszonen zum Display hin bis zum Anschlag ein.
- Lesen Sie den Meßwert ab.
- Vergleichen Sie für Ihr Protokoll das Ergebnis mit dem erwarteten Wert und kommentieren Sie dies.

2 Versuchstag 2: Einfache und komplexe Biomoleküle

2.1 Platz 1: Weiterführung einfache Biomoleküle

2.1.1 Kohlehydrate und verwandte Verbindungen Teil II (Altskript 2.2)

2.1.1.R Versuch: Reduzierende und nicht-reduzierende Zucker

(VF 5.1, Altskript V 2.7 bzw. 2.8)

Fehling'sche Lösung:

Alkalische Kupfer(II)salzlösungen werden durch reduzierende Zucker unter Abscheidung von rotem, unlöslichem Kupfer(I)oxid reduziert. Durch einen zugesetzten Komplexbildner (Tartrat = Salz der Weinsäure) muß verhindert werden, daß in der alkalischen Lösung auch Kupfer(II)hydroxid ausgefällt wird. Die Fehling-Probe hat noch immer Bedeutung als qualitativer Test auf reduzierende Zucker.

Reaktionsgleichung: $2\ Cu^{2+} + R\text{-}CHO + 5\ OH^- \rightarrow Cu_2O + R\text{-}COO^- + 3\ H_2O$

- Stellen sie sicher das pro Gruppe je 10 ml Fehling I und 10 ml Fehling II zur Verfügung stehen.
- Stellen Sie ggf. 200 ml Fehling'sche Lösung I bereit:
  70g $CuSO_4.5\ H_2O$ in 1l Wasser
- Stellen Sie ggf. 200 ml Fehling'sche Lösung II bereit:
  340g KNa-Tartrat in 1l 2,5M NaOH

Durchführung:

*Die Bereitstellung von Fehling-Lösung für 2.1.1.R und **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** erfolgt jeweils für alle Teilnehmer an einem Versuchstag durch die erste Gruppe, die diesen Versuch durchführt.*

- Stellen Sie mehrere Proben mit unterschiedlichen Zuckern her:
  Verwenden Sie hierzu Glucose, Fructose, Saccharose (je 10mg/ml).
- In Absprache mit dem Betreuer stellt an dieser Stelle die erste Laborgruppe eine ausreichende Menge an Zuckerlösungen für alle Anwesenden (plus etwas Reserve) her, z.B. 200 mg Zucker auf 20 ml destilliertes Wasser, für jede zu untersuchende Zuckerart.
- Mischen Sie 10 ml Fehling-I mit 10 ml Fehling-II.
- Notieren Sie Ihre Beobachtung.
- Fügen Sie zu ca. 3ml dieser Fehling-I+II-Mischung die zu analysierende Probe zu (ca. 2ml, Einmalpipette).
- Erwärmen Sie die Mischung mit der Probe im siedenden Wasserbad.
- Erwärmen Sie zum Vergleich als Blindprobe auch eine Fehling-I+II-Mischung ohne Zucker (Blindprobe).
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtungen.
- Vergleichen Sie Proben auf ihre Reduktionskraft.
- Identifizieren Sie die Strukturen der jeweiligen Zucker.

Mat.: Becherglas 50ml

2.1.1.S Versuch: Silberspiegel (VL 14.2, Altskript V 2.8 bzw. 2.9)

- Geben Sie in ein sauberes, **neues** Reagenzglas ca. 2ml $AgNO_3$ (w=10%)
- Setzen Sie unter ständigem Schütteln mit der Tropfflasche langsam soviel NH_3 zu (ca. 1:1), bis sich der gerade gebildete Niederschlag gerade wieder gelöst hat.
- Geben Sie nun ca. 2ml Glucoselösung (w=1%) zu.
- Erhitzen Sie das Reagenzglas unter leichtem Drehen im Wasserbad oder über dem Bunsenbrenner.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtung.
  Welche Schlußfolgerung (Reaktion) können Sie daraus ziehen?

2.1.1.T Versuch: Hydrolyse von Stärke (VL22.3, Altskript V 2.10)

- Geben sie 0,5 g Stärke in ein Becherglas.
- Geben Sie ca. 5 ml HCl (5M) zu.
- Entnehmen Sie mit einer Pipette 0,1 ml und geben Sie diese in ein frisches Reagenzglas (16X100).
- Erhitzen Sie nun die Stärkelösung im siedenden Wasserbad.
- Entnehmen Sie im Laufe der Erwärumung alle 2 min mit einer Pipette je 0,1 ml und geben Sie diese in ein frisches Reagenzglas.

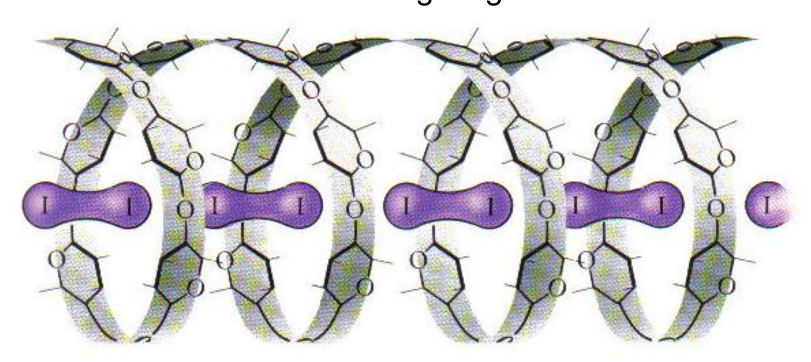


Abbildung 6: Jod-Stärke-Einschlussverbindung

- Geben Sie zu jeder dieser entnommenen Proben je ca. 1ml H_2O und je 1 Tropfen KI_3-Lösung.
- Geben Sie zu jeder nach jeweils nach 2 weiteren Minuten entnommenen Probe separat wiederum je ca. 1ml destilliertes Wasser und je 1 Tr. KI_3-Lösung.
- Wiederholen Sie dieses Vorgehen solange, bis bei Zusetzen der KI_3-Lösung zur entnommenen Probe keine Blaufärbung mehr auftritt.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtung.
- Kommentieren Sie Ihre Beobachtungen im Bezug auf die Struktur (Abbildung 6)?

Mat.: Reagenzglas 16x100

2.1.1.U Versuch: Glucosenachweis (VL22.4, Altskript V 2.11)

- Stellen Sie 1 ml der abgekühlten Lösung aus 2.1.1.T bereit.
- Neutralisieren Sie diese, Geben Sie hierzu 4,5 ml NaOH (1M) zu, und danach festes $NaHCO_3$ bis zum Ende der Gasbildung.
- Prüfen Sie die neutralisierte Lösung mit Fehlingscher Lösung sowie mit Glucoseteststreifen (siehe 1.4.2.Q Versuch: Glucosebestimmung mit Glucoseoxidase / GOD-NAD-Test **(VF 5.2, Altskript V 2.9 bzw. 2.7)**) .

Mat.: Reagenzglas 16x100

2.1.2 Vitamine (Altskript 2.3)

2.1.2.V Versuch: Ascorbinsäure (VF 5.6, Altskript V 2.12)

L(+)-Ascorbinsäure oder Vitamin C ($C_6H_80_6$) ist biosynthetisch und strukturell mit den Zuckern verwandt, unterscheidet sich aber erheblich in der chemischen Reaktivität und Funktion.

Abbildung 7: Ascorbinsäure

Aufgabe:
Bestimmen Sie nach Absprache den Ascorbinsäuregehalt

a) in einem klaren, hellen Fruchtsaft,
b) in frisch ausgepreßtem Zitronensaft (bei Bereichsüberschreitung mit H_2O verdünnen)

Durchführung:

- Benutzen Sie hierzu Teststreifen vom Typ Merck 1.10023
  (Die Bestimmung beruht auf der Reduktion des gelb gefärbten Phosphor-molybdato-komplexes durch Ascorbinsäure zu Molybdän-blau).
- Tauchen Sie ein Teststäbchen ca. 1 Sekunde in die zu untersuchende Lösung so ein, daß die Reaktionszone voll benetzt wird.
- Schütteln Sie überschüssige Flüssigkeit nach Herausnehmen des Teststäbchens ab.
- Vergleichen Sie nach ca. 10 Sekunden die Reaktionszone mit der Farbskala.
- Berechnen Sie die Ascorbinsäure-Menge in der Probe, in einem Liter Getränk und einer ganzen, vollständig ausgepreßten Zitrone.
- Recherchieren Sie für Ihr Skript den Tagesbedarf eines erwachsenen Menschen. Wie viel Zitrone bzw. Fruchtgetränk brauchen Sie demnach zur Deckung des Tagesbedarfs?

2.1.2.W Versuch: Fehling-Test (VL 68.4, Altskript V 2.14)

- Stellen Sie die zu analysierenden Probe her:
  Pro Gruppe werden ca. 5ml Ascorbinsäure mit 1mg/ml benötigt.
- In Absprache mit dem Betreuer stellt an dieser Stelle die erste Laborgruppe eine ausreichende Menge an Ascorbinsäurelösung für alle Anwesenden (plus etwas Reserve) her, z.B. 40 mg Ascorbinsäure auf 40 ml destilliertes Wasser
- Fügen Sie zu ca. 3ml der Fehling-I+II-Mischung aus 2.1.1.R die zu analysierende Probe zu.
- Erwärmen Sie die Mischung mit der Probe im siedenden Wasserbad auf ca. 100˚C, geben sie ggf. einen weiter Spatel Ascorbinsäure hinzu.
- Erwärmen Sie zum Vergleich als Blindprobe auch eine Fehling-I+II-Mischung ohne Ascorbinsäure (Blindprobe).
- Notieren Sie für Ihr Protokoll Ihre Beobachtungen.
- Vergleichen Sie Proben auf ihre Reduktionskraft.

2.1.2.X Versuch: Reduzierende Wirkung von Ascorbinsäure (Silberspiegel) (VL 68.2, Altskript V 2.13)

- Geben Sie in ein sauberes, neues Reagenzglas ca. 2ml 10% $AgNO_3$-Lösung.
- Fügen Sie tropfenweise mit der Pasteurpipette Ammoniaklösung zu, bis sich der zuerst entstehende Niederschlag wieder aufgelöst hat (ca. 1:1).
- Geben Sie dazu Ascorbinsäurelösung (ca.5ml mit 1mg/ml)
- Erwärmen Sie das ganze vorsichtig im Wasserbad
  (Achtung: wird zu schnell erhitzt, fällt ein schwarzer Silberniederschlag aus).

2.2 Platz 2: Aminosäuren und Proteine, pH-Messungen

2.2.1 Aminosäuren (Altskript 2.4.1)

2.2.1.Y Versuch: Titration von Glycin (VF 3.2, Altskript V 2.15)

Bei der Titration wird ein bekannter Stoff mit unbekannter Konzentration in einer gezielten chemischen Reaktion mit einer Maßlösung bekannter Konzentration umgesetzt. Das Volumen der verbrauchten Maßlösung wird dabei gemessen und anhand der Stöchiometrie die unbekannte Konzentration der Probelösung berechnet.

Wegen der Existenz von mehreren pK-Werten mit entsprechenden Pufferbereichen (pH $\approx$ pK) sind die Titrationskurven von Aminosäuren mehrfach zusammengesetzt und die pH-Sprünge an den Äquivalenzpunkten bei 100% Titration nur schwach ausgeprägt. Eine einfache titrimetrische Bestimmung von freien Aminosäuren mit Säuren oder Laugen und den üblichen Indikatoren gelingt daher nicht. In Gegenwart von Formaldehyd („Formalin") wird die Aminogruppe in eine schwach basische Methylenverbindung umgewandelt, so daß nur noch die Karbonsäure titriert wird („Titration nach Sörensen").

- Recherchieren Sie den Umschlagspunkt (pH-Wert) von Thymolphthalein
- Lösen Sie in einem 250 ml Becherglas 20 mmol kristallisiertes Glycin in ca. 100 ml H_2O. Bestimmen Sie anhand der molaren Masse auf dem Etikett des Glycin, wieviel Gramm sie benötigen.
- Kalibrieren Sie das pH-Meter mit Maßlösung. Spülen Sie den Prüfkopf vor und nach Gebrauch gründlich mit destilliertem Wasser! Achten Sie darauf, den Prüfkopf des pH-Meters in ein Reagenzglas mit destilliertem Wasser abzustellen, wenn er nicht in Gebrauch ist.
- Messen Sie den pH-Wert und notieren Sie diesen für Ihr Protokoll. Warten Sie einige Momente, bis sich aufgrund der Durchmischung der entsprechende pH-Wert stabil eingestellt hat. Begründen Sie für Ihr Protokoll, warum der pH-Wert hier gleich dem isoelektrischen Punkt ist.
- Versetzen Sie mit einigen Tropfen Thymolphthaleinlösung 0,1% .
- Überlegen Sie, welches Volumen Natronlauge (1M) theoretisch erforderlich wäre, um eine deutliche Blaufärbung des Indikators hervorzurufen und legen Sie Ihre Rechnung im Protokoll dar.
- Titrieren Sie mit NaOH (1M). Messen Sie dabei in Intervallen von 1ml den pH-Wert und notieren Sie diesen für Ihr Protokoll. Warten Sie bis sich der pH-Wert einigermaßen stabil eingestellt hat.
- Titrieren Sie bis zur deutlich erkennbaren Blaufärbung.
- Notieren Sie für Ihr Protokoll, welches Volumen NaOH hierfür erforderlich war.
- Vergleichen Sie den Verbrauch mit dem theoretischen Wert.
- Nun geben Sie ca. 20ml säurefreie 20% Formaldehydlösung zu (Unter dem Abzug! – leicht flüchtig und giftig!) und titrieren Sie erneut bis zum Umschlag.
- Messen Sie wieder zusätzlich parallel mit dem pH-Meter. Geben Sie in der Nähe des Äquivalenzpunktes nur kleine Volumina Natronlauge hinzu (im Zweifelsfalle tropfenweise), da es hier zu einer schnellen pH-Änderung kommt; messen sie nach jeder Laugenzugabe nach (in ebenso kleinen Schritten). Messen Sie bis 25ml NaOH.
- Tragen Sie für Ihr Protokoll die gemessenen pH-Werte in Abhängigkeit von der NaOH-Zugabe graphisch auf (z.B. mit Hilfe einer Tabellenkalkulation).

2.2.2 Typische Reaktionen von Proteinen (Altskript 2.4.2)

Ausfällung:
Bei einem Protein sind bei einem bestimmten pH-Wert, dem sog. isoelektrischen Punkt (IEP oder pI), gleich viele Säuregruppen negativ geladen wie Aminogruppen positiv geladen sind. Die Löslichkeit von Proteinen wird nicht nur von den geladenen Gruppen und dem isoelektrischen Punkt bestimmt, sondern auch von der Art und Anzahl weiterer polarer, mehr oder weniger hydrophiler bzw. hydrophober Gruppen (also der Aminosäurezusammensetzung), ferner von deren räumlicher Verteilung. Bei pH-Werten abseits des IP sind die Moleküle alle gleichsinnig geladen und stoßen sich ab. Am IP fällt diese Abstoßung weg und die Moleküle können unter intermolekularer Wechselwirkung zwischen + - und - - Ladungen aggregieren: Die Proteine fallen aus oder "flocken aus". Da die "native" Struktur eines Proteins in Lösung durch eine Kombination vieler verschiedener Wechselwirkungskräfte (ionische und dipolare Kräfte, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen sowie eine geordnete Hydrathülle) aufrechterhalten wird, ist sie störanfällig: Bei Änderungen der Zusammensetzung der Lösung und der äußeren Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) fallen viele Proteine unlöslich aus und "denaturieren".
Casein ist der Haupteiweißbestandteil der Milch (in Kuhmilch: 3 %). Casein ist bei schwach alkalischem pH löslich.

- Recherchieren Sie für Ihr Protokoll, welche physiologische Funktion Casein hat.

2.2.2.Z Versuch: Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit von Casein (VF 3.3, Altskript V 2.16)

- Sie erhalten eine vorbereitete Lösung von Casein in 0,2 M Natriumacetat (Gehalt ca. 5mg/ml). Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welchen pH-Wert eine 0,2 M Acetatlösung theoretisch hat (pK_s von Essigsäure ist 4,8).
- Der zu erstellende Befund der Casein-Lösung wird mit dem Naturprodukt verglichen: Mischen Sie hierzu 25ml Magermilch und 25ml 0,4M Natriumacetat und führen Sie den **gesamten Versuch insg. 2x** durch, einmal mit der Casein-Löung und auch einmal mit der Milch-Natrium-Acetat-Mischung durch.
- Bereiten Sie 2 Reihen á 8 numerierte Reagenzgläser (16X160 oder 16X130) vor, legen eine kleine Tabelle an und beschicken die Gläser mit Essigsäure (0,2 M) in jeweils folgenden Volumina 0,1 ml ; 0,3 ml ; 0,6 ml ; 1,0 ml ; 2,0 ml ; 4,0 ml ; 6,0 ml ; und 9,0 ml, und füllen Sie jedes Reagenzglas auf 9 ml auf (also dann in derselben Reihenfolge mit 8,9 ml ; 8,7 ml ; 8,4 ml ; 8,0 ml ; 7,0 ml ; 5,0 ml ; 3,0 ml ; und 0 ml Wasser).
- Pipettieren Sie in die erste Reihe (8 Reagensgläser) nun zügig je 1,0 ml der Casein-Lösung und schütteln um.
- Pipettieren Sie in die zweite Reihe (8 Reagensgläser) nun zügig je 1,0 ml der Milch-Natrium-Acetat-Mischung und schütteln um.
- Notieren Sie den Ausfällungsgrad in den einzelnen Gläsern (○○○● nicht nennenswert - ○○●● erkennbar - ○●●● stark - ●●●● stärker).
- Notieren Sie für Ihr Protokoll ihre Beobachtungen (der Vorgang der "Gerinnung" ist im Detail komplex, weil das Casein kein einheitliches Protein ist.)
- Berechnen Sie die pH-Werte der entstandenen Puffer-Mischungen auf eine Stelle hinter dem Komma (pKs 4,8).

- Benutzen Sie keine Glaselektrode! Die Glasmembran einer pH-Elektrode wird durch Fett-/Proteinfilme stark verschmutzt! Benutzen Sie daher NUR Spezial-indikatorpapier und stellen Sie so den isoelektrischen Punkt des Proteins fest.
- Begründen Sie in Ihrem Protokoll, warum (durch welche Zusammensetzung) er in diesem pH-Bereich liegt.

2.2.2.Z

Nr.	Essigsäure [ml]	H_2O [ml]	Casein-Lsg bzw. Milchmisch. [ml]	Gesamtvol. [ml]
I	0,1	8,9	1,0	10,0
II	0,3	8,7	1,0	10,0
III	0,6	8,4	1,0	10,0
IV	1,0	8,0	1,0	10,0
V	2,0	7,0	1,0	10,0
VI	4,0	5,0	1,0	10,0
VII	6,0	3,0	1,0	10,0
VIII	9,0	0,0	1,0	10,0

Tabelle 3

2.2.2.Z

Ausfällung (Casein-Lsg)	pH (Casein-Lsg)		Ausfällung (Milchmisch.)	pH (Milchmisch.)
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	
○○○○			○○○○	

Tabelle 4

2.3 Platz 3: Protein-Fällung und –Chromatographie

2.3.1 Protein-Fällung

2.3.1.AA Versuch: Fällungsarten von Proteinen (VL 26.5, Altskript V 2.17)

- Nehmen Sie ein Ei pro 2 Gruppen und zwei ausreichend große Bechergläser zur Hand (das Eifiltrat wie folgt wird von der ersten Gruppe für alle Versuchsteilnehmer an diesem Versuchstag hergestellt) und wiegen sie die Bechergläser vorsorglich ab.
- Trennen Sie das Ei in Eiklar und Eigelb und bewahren Sie diese zunächst getrennt voneinander auf. **Wiegen Sie das Eiklar ab**.
- Geben Sie zu dem Eiklar **pro** Ei 100 ml Wasser und 2g Kochsalz du verrühren Sie das ganze mit einem Rührstab (elektrisch).
- Legen Sie eine Schicht Glaswolle in einen Trichter und filtrieren Sie die Eiklar-Wasser-Salz-Mischung durch diese in ein neues Becherglas.
- Prüfen Sie, ob das Filtrat dünnflüssig genug ist, um sich in kleinen Mengen umfüllen zu lassen (unbehandeltes Eiklar ist zu zähflüssig für den weiteren Versuchsverlauf).
- Befüllen Sie 6 Reagenzgläser (a-f) mit jeweils ca. 5 ml des Eifiltrats.
- Beschriften Sie mit einem geeigneten Stift jedes der Reagenzgläser mit dem entsprechenden Buchstaben.
- Führen Sie nun mit jedem der Reagenzgläser zunächst untenstehende Behandlung einmal durch und notieren Sie Ihre Beobachtung für Ihr Protokoll (wie steht es mit der Löslichkeit bzw. in welchen Fällen kommt es zu Niederschlagsbildung?). Bewahren Sie die Reagenzgläser zunächst noch auf (s.u.).

1. Erhitzen Sie Probe a im Wasserbad langsam bis zum Sieden. Messen Sie dabei die Temperatur mittels eines Thermometers. Notieren Sie für Ihr Protokoll die Temperatur, bei der erstmals Niederschlagsbildung sichtbar erfolgt.
2. Versetzen Sie Probe b mit 5ml Ethanol (w=96%) und schütteln Sie diese gut.
3. Stellen Sie 30 ml $(NH_4)_2SO_4$ bereit (15g pro 30 ml – wird von der ersten Gruppe für alle Teilnehmer an diesem Versuchstag hergestellt). Versetzen Sie Probe c mit 5ml der konz. Ammoniumsulfatlösung.
4. ***Unterschichten*** Sie Probe d unter dem Abzug vorsichtig und langsam mit 2ml konz. HNO_3. Tragen Sie dabei Handschuhe und Schutzbrille. Beobachten Sie dabei besonders die Grenzfläche. Sobald sich keine weitere neue Beobachtung einstellt, verschließen Sie das Reagenzglas fest und schütteln Sie es gründlich.
5. Stellen Sie 30ml $CuSO_4$ (1M) bereit. Versetzten Sie Probe e langsam damit und durchmischen Sie sie gut.
6. Versetzen Sie unter dem Abzug Probe f mit 1ml 70%iger Trichlor-Essigsäure-Lösung (Vorsicht, .ätzend). Tragen Sie dabei Handschuhe und Schutzbrille! Was ist zu beobachten? Wie nennt man solche Niederschläge im Gegensatz zu einem kristallinen Salz?

- Nun prüfen Sie für alle Proben (a-f), ob sich das Protein beim Verdünnen mit Wasser wieder auflöst. Nach dem alle Proben auf Bildung eines Niederschlags geprüft sind, gibt man jede der Probe einzeln in ein jeweils neues Becherglas mit 30 ml und beobachtet den Effekt? Ziehen Sie für Ihr Protokoll Schlußfolgerungen aus Ihren Beobachtungen (Stichwort: Reversibilität).

2.3.1.BB Versuch: Biuret-Reaktion (VL 26.2, Altskript V 2.18)

- Stellen Sie 2ml des Eifiltrats aus Versuch 2.3.1.AA bereit.
- Geben Sie 2ml NaOH (1M) dazu (Handschuhe, Brille).
- Geben Sie tropfenweise $CuSO_4$ (0,01M) zu, bis eine Violettfärbung zu sehen ist.
- Erwärmen Sie das Ganze, bis sich eine braune Färbung einstellt.
- Wiederholen Sie den Versuch mit einer Blindprobe OHNE Eiweiß, d.h. Sie geben nur 2 ml NaOH (1M) in ein Reagenzglas und tropfen $CuSO_4$ (0,01M) zu, bis eine Blaufärbung zu sehen ist und erwärmen das ganze, bis sich erste Schlieren bilden.

2.3.1.CC Versuch: Proteinbestimmung (VF 3.5, Altskript V 2.19)

Photometrische Proteinbestimmung bei 280nm

- Wiederholen Sie im Überblick die Grundlagen der Photometrie vom ersten Versuchstag, insb. das Lambert-Beersche Gesetz.

  Die in jedem Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan absorbieren UV-Licht im Bereich um 280nm.
  Eine für viele Proteine zutreffende und oft ausreichende überschlägige Proteinbestimmung gelingt mit der Faustformel:

  E_{280}=1 entspricht 1mg/ml Protein

  Diese Methode setzt natürlich die Abwesenheit von anderen UV-absorbierenden Stoffen (z.B. Nucleinsäuren) voraus.
- Überlegen Sie, was ein Extinktionswert von 1 bedeutet. Welche Transmission T herrscht bei E=1 ? Welche Absorbtion dementsprechend? Welcher Art ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration?
- Machen Sie sich erneut mit den zu verwendenden Kolbenpipetten vertraut (Stichwort erster bzw. zweiter Druckpunkt) und stellen Sie sicher, daß diese einwandfrei funktionieren.
- Verdünnen Sie das Eifiltrat aus 2.3.1.AA jeweils in den Verhältnissen 1:20, 1:50 und 1:200. Achten Sie darauf, die Proben nicht zu vertauschen.
- Befüllen Sie je 1 Quarzküvette (1cm) mit den verdünnten Proben.
- Füllen Sie eine Quarzküvette mit destilliertem Wasser (Referenz).
- Stellen Sie die Wellenlänge des Spektroskops auf 280 nm ein.
- Führen Sie mit der Referenz einen Nullabgleich (100%T, E=0) durch.
- Messen Sie dann für beide Proben die Extinktion E
- Berechnen Sie für Ihr Protokoll bei den gemessenen Extinktionswerten den Proteingehalt der Filtrat-Verdünnungen bzw. des ursprünglichen Filtrats.

2.3.2 Protein-Chromatographie

2.3.2.DD Versuch: Papierchromatographie (Rundfiltermethode)

(VL 162.1, Altskript V 2.22)

- Im Vorfeld wurden von ihrem Dozenten einige Milliliter Eiklar aus Versuch 2.3.1.AA oder anderweitige Eiweiße mit dem gleichen Volumen konz. Salzsäure HCl über eine Dauer von 6 Stunden am Rückfluß bei 120°C gekocht (Abzug!). Die Säure wurde im Rotationsverdampfer abgezogen und vom festen Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wurde noch weiter eingeengt. Vergewissern Sie sich, daß am Ende ihres Versuches noch eine ausreichende Menge dieses Filtrats für alle Gruppen des folgenden Versuchstages verbleibt und informieren Sie rechtzeitig Ihren Betreuer, falls neues Filtrat hergestellt werden sollte.
- Überlegen Sie, welche Folgen diese Behandlung für die Inhaltsstoffe hat.
- Öffnen Sie die Eiweißprobe und riechen Sie vorsichtig daran. Notieren Sie für Ihr Protokoll, wonach es riecht bzw. woran Sie der Geruch erinnert. Überlegen Sie, woher diese olfaktorische Ähnlichkeit kommt.
- Bei verschiedensten Arten der Chromatographie werden unterschiedliche Teilcheneigenschaften genutzt. Teilchen werden in einer mobilen Phase (Lösungsmittel) gegenüber einer festen Phase in Bewegung versetzt und weisen dabei aufgrund ihrer Eigenschaften unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten auf. Teilchen mit gleichen Eigenschaften wandern gleich schnell und bilden Streifen, die sichtbar eingefärbt sog. Bande bilden. Diese können mit den Banden bekannter Referenzmittel verglichen werden.
- Bei der Papierchromatographie werden Teilchen aufgrund ihrer Größe differenziert. Verschieden große Teilchen wandern unterschiedlich schnell durch die Poren eines Filterpapiers.
- Bereiten Sie eine Flasche Laufmittel in ausreichender Menge für alle Teilnehmer des Praktikums vor. Das Laufmittel besteht aus einer Mischung aus Butanol/Essigsäure/Wasser (destilliert) im Volumen-Verhältnis 4:1:1 (d.h. 4 Teile Butanol auf je 1 Teil Essigsäure und Wasser. Eine Menge von 200 ml sollte ausreichen. Das Laufmittel riecht stark, stellen Sie es also *unter dem Abzug* her, verwenden Sie es nur dort und belassen sie es dort!
- Nehmen Sie ein rundes Filterpapier, einen Bleistift und einen Zirkel (oder als Ersatz eine Münze) zur Hand.
- Markieren Sie das Zentrum des Rundfilterpapiers und Zeichnen Sie optisch korrekt mit dem Bleistift mittig einen Kreis mit ca. 1 cm Radius um den Mittelpunkt, den sog. Startkreis.
- Informieren Sie sich, wieviele Proben und Referenzen verwendet werden und teilen Sie das Rundfilterpapier mit dem Bleistift in entsprechend viele „Kuchenstücke". Im vorliegenden Versuch werden i.d.R. 1 Probe und 3 Referenzen betrachtet, Sie müssen das Rundfilterpapier also i.d.R. nur mit 2 rechtwinklig zueinander stehenden Strichen in 4 Segmente teilen (sollten 4 Referenzen zur Verfügung stehen, teilen Sie das Papier dementsprechend in 5 Segmente).

- Als Proben werden i.d.R. 3 Lösungen mit je 1 bestimmten Aminosäure verwendet, wie z.B. Alanin, Glycin, Tyrosin (je eine Spatelspitze auf ein Reagenglas (16X160) mit destiliertem Wasser auffüllen, gut schütteln).
- Beschriften Sie die Segmente am äußeren Rand des Rundfilterpapiers mit der Bezeichnung oder einem Kürzel jeweils für die Probe und die jeweilige Referenz (z.B. Ei, A, G, T). Fügen Sie der Probenbezeichnung außerdem das Datum und Ihre Gruppenbezeichnung hinzu, so daß Ihr Papier später für Sie wiedererkennbar sein wird.
- Nehmen Sie ein weiteres Filterpapier zur Hand, schneiden Sie ein Stück daraus aus und rollen Sie damit eng einen ca. 2 cm langen Docht.
- Stechen Sie ein kleines Loch in die Mitte Ihres segmentierten Filterpapiers, durch das sie später den Docht stecken können.
- Tragen sie nun mithilfe von je 1 Glaskapillare auf den Startkreis in jedem Segment die zur dort eingetragenen Beschriftung passende Referenz bzw. die Probe auf. zwei bis drei kleine Tropfen aus der Kapillare reichen völlig aus. Tropfen Sie diese auf den mittleren Teil des jeweiligen Segmentes des Startkreises, lassen sie die Ränder frei, so daß nicht eine Substanz in das Nachbarsegment hinüberlaufen kann.
- Stecken Sie Ihren vorbereiteten Docht in das dafür vorgesehene Loch im Rundfilterpaper.
- Nehmen Sie 2 gleichgroße Petrischalen zur Hand, deren Durchmesser nur wenig kleiner ist, als der des Rundfilterpapiers.
- Befüllen Sie eine der beiden Petrischalen unter dem Abzug bis zur Hälfte mit dem Laufmittel.
- Legen Sie Ihr Rundfilterpapier so auf den Rändern der Petrischale mit dem Laufmittel auf, daß der Docht in das Laufmittel taucht, das Rundfilterpapier jedoch nicht mit dem Laufmittel in Berührung kommt.
- Decken Sie das Ganze vorsichtig mit der zweiten Petrischale ab.
- Das Laufmittel fließt nun durch den Docht in die Mitte des Rundfilterpapiers und von dort randwärts, dabei werden Teilchen transportiert. Wenn das Laufmittel den Rand der Petrischale erreicht hat (nach ca. 10 bis 12 Minuten, allerhöchstens nach 15 Minuten), nehmen Sie vorsichtig die Abdeckung und entfernen Sie ihr Filterpapier aus der Petrischale.
- Zu langes Warten schwemmt alle Teilchen an den Rand des Papiers und der gesamte Versuch muß wiederholt werden!
- Entfernen Sie vorsichtig den Docht (Pinzette, nicht mit Fingern anfassen), achten Sie dabei darauf, das feucht Rundfilterpapier nicht einzureißen.
- Legen Sie das Rundfilterpapier zum Trocken unter den Abzug.
- Ihr Dozent besprüht das Chromatogramm später mit einem als Färbemittel dienenden Ninhydrinreagenz und trocknet es anschließend bei 110°C (mittels eines Föns). Nun erst zeigen sich die Aminosäuren mit charakteristischen Färbungen.
- Ihr Dozent scannt das Ergebnis optisch als Datei ein.
- Sichern Sie dieses Bild auf einem Datenträger und fügen Sie es in Ihr Protokoll ein. Kommentieren Sie, was auf dem Chromatogramm zu sehen ist.

2.4 *Platz 4: Proteinbestimmung durch Elektrophorese*

2.4.1 Gel-Elektrophorese

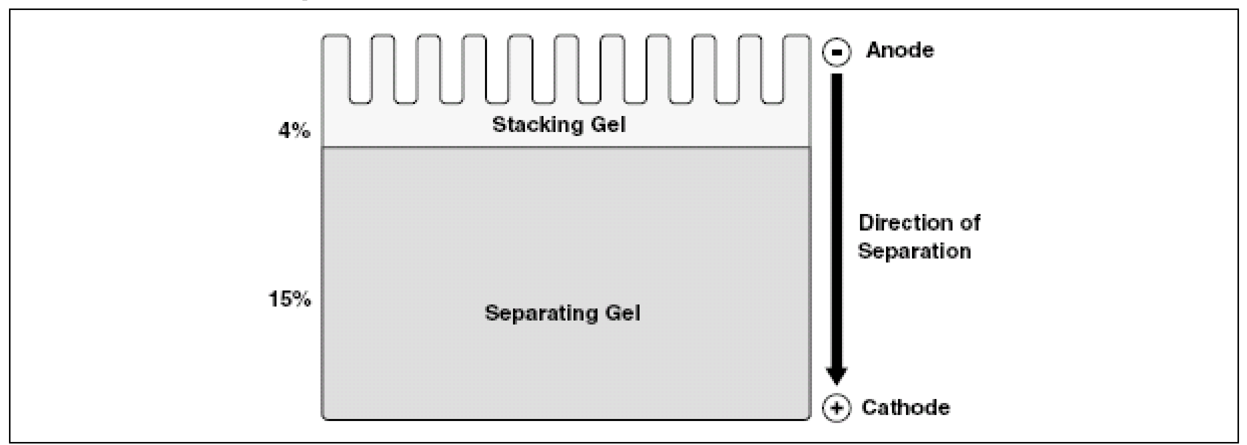


Abbildung 8: Diagramm eines Elektrophorese-Gels

Bei der Elektrophorese werden Teilchen unterschiedlicher Ladung (und Größe) mithilfe eines elektrischen Feldes voneinander getrennt. Aufgrund ihrer Ladung wandern sie im elektrischen Feld, dabei weisen verschiedene Teilchen unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten auf. Teilchen mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit bilden dabei jeweils Bande, die dann durch Anfärbung sichtbar gemacht werden können.

2.4.1.EE Versuch: Protein-Fingerprinting durch Gel-Elektrophorese (PAGE) (VB1, Altskript V 2.23)

Verwendetes System: Biotechnology Explorer™: Protein Fingerprinting
Catalog Number166-0100EDU explorer.bio-rad.com

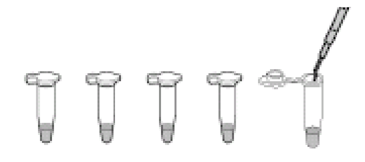
A. - Probenvorbereitung: Muskel-Protein-Extraktion

- Wenden Sie sich an Ihre Betreuer, um Proben unterschiedlicher Protein-Extrakte zu erhalten (i.d.R. von verschiedenen Fischarten). Die Proteine werden mit einer geeigneten Methode extrahiert und denaturiert (s.u.).
- Prüfen Sie anhand folgender Check-Liste, ob alle für die Versuchsvorbereitung erforderlichen Arbeitsmittel zur Verfügung stehen:

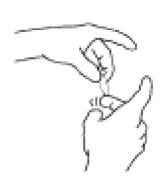
Arbeitsmittel	**Stückzahl pro Gruppe**	**✔**
Mikro-Probenröhrchen (Flipp-Deckel)	4	□
Mikro-Probenröhrchen (Schraubdeckel)	4	□
1,0 ml Einwegpipette	1	□
Wasserfester Stift	1	□
Laemmli Proben-Pufferlösung	1 ml	□
Fisch-Proben	4	□

Tabelle 5: Labor-Checkliste (✔)

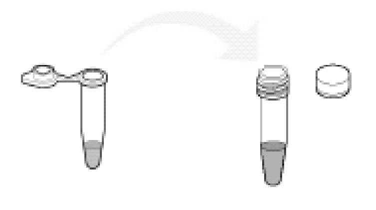
Schritt 1: Vorgehensweise bei Vorbereitung der Muskelproteinproben



- Beschriften Sie mit einem Wasserfesten Stift die Flippdeckel-Mikro-Probenröhrchen mit den Namen der für die Probe jeweils verwendeten Fisch-Spezies. Bereiten Sie ein Probenröhrchen pro Fisch-Spezies (pro Gruppe) vor.
- Fügen Sie jedem dieser Probenröhrchen mit einer geeigneten Pipette 250 µl Bio-Rad-Laemmli-Probenpuffer-Lösung zu.
- Geben sie in jedes dieser Probenröhrchen ein kleines Stück (ca. 3mm Kantenlänge) des jeweiligen Fisch-Muskelgewebes. Befreien Sie das Stück so gut wie möglich von Haut, Fett und Knochen. Schließen Sie den Deckel fest.



- Schnippen Sie mit dem Finger ca. 15x an das Probenröhrchen, um das Gewebe gut mit Puffer zu tränken.
- Inkubieren Sie die Proben ca. 5 Minuten lang bei Raumtemperatur, um die Proteine zu extrahieren und zu lösen.
- Gießen sie den gelöste Proteine enthaltenden Puffer OHNE das Gewebestück in ein Schraubdeckel- Mikro-Probenröhrchen. Es ist dabei nicht unbedingt erforderlich, die Flüssigkeit restlos zu transferieren, da das Gel später ohnehin nur mit einer kleinen Menge jeder Probe (je <20µl) beladen wird.



- Bei Raumtemperatur können die Proben höchstens 3 Stunden aufbewahrt werden, bevor sie in die Gelkammer gegeben werden. Bei –20°C können Sie einige Wochen aufbewahrt werden.
- Stellen Sie mit Hilfe Ihrer Betreuer eine definierte Menge von KS (Kaleidoskop-Standard) und AM (Actin-/Myosin-Standard) bereit. Überlegen Sie für Ihr Protokoll, wozu diese Standards dienen.
- Erhitzen sie Die Schraubdeckel-Probenröhrchen sowie den AM-Standard (im Schraubdeckel-Probenröhrchen) für ca. 5 Minuten bei 95°C, um die Proteine zu denaturieren und so in eine für die Elektrophorese geeignete Form zu überführen.
- Was passiert dabei?

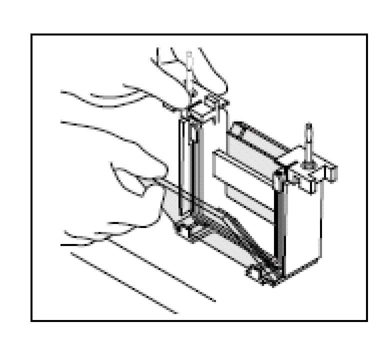
B. Elektrophorese: Gel beladen, Elektrophorese starten und Bande färben

- Bereiten Sie die Elektrophorese-Gel-Boxen vor (s.u.).
- Beladen Sie die Gelkammern und starten Sie die Elektrophorese (s.u.).
- Färben Sie die nach der Elektrophorese die Gele and, um die Proteinbande sichtbar zu machen.
- Prüfen Sie anhand folgender Check-Liste, ob alle für den weiteren Versuchsverlauf erforderlichen Arbeitsmittel zur Verfügung stehen:

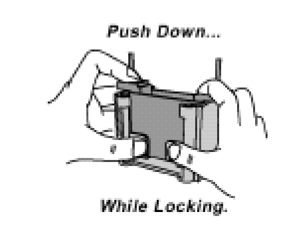
Arbeitsmittel	Stückzahl pro Gruppe	✔
Vorbereitete Fischproben	4	□
Mikro-Kolbenpipette (2 bis 20 µl)	1	□
Feine Pipettespitzen (zum Gel-Beladen)	1	□
Dünner Abwiege-Metallspatel	1	□
Mini-Protein-3-Electrophorese-Modul-Gelbox	1	□
Puffer-Abgrenzung („Buffer-Dam“)	1	□
Vorgegossenes Gel, 15%ig, 10 Kammern	1 Gel für 2 Gruppen	□

Tabelle 6: Labor-Checkliste (✔)

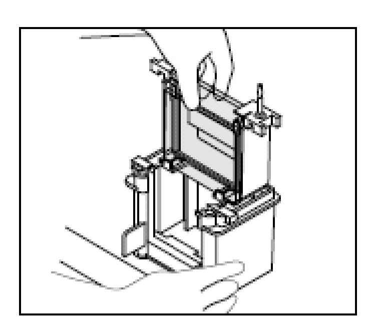
Schritt 2: Vorbereiten der Gelkammern



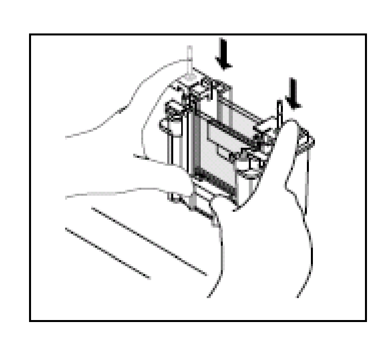
- Bereiten Sie eine Gelkassette vor, indem sie mit einer scharfen Klinge entlang der schwarzen Linie am Boden der Kassette entlangschneiden und den Plastikstreifen entfernen (siehe Abbildung und Beschriftung auf der jeweiligen Gelkassette).
- Stellen Sie sicher, daß vor Beginn der eigentlichen Elektrophorese weder Kamm noch Klebeband in der Gelkassette sind.



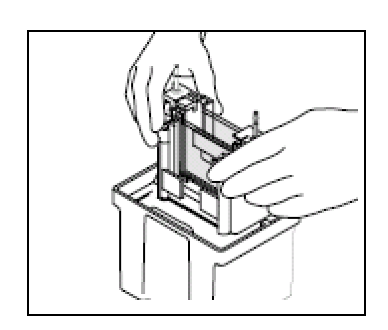
- Wenn Sie zwei Gele simultan laufen lassen, plazieren Sie je 1 Gelkassette auf jeder Seite der Elektrodenanordnung, und zwar mit der kurzen Platte (mit dem kürzeren Streifen gekennzeichnet) nach innen gerichtet (in Richtung der Elektrodenanordnung). Wenn Sie nur 1 Gel laufen lassen, plazieren Sie 1 Gelkassette auf einer Seite der Elektrodenanordnung, und die Puffer-Abgrenzung („Buffer-Dam“) auf der anderen Seite (mit der Kerbe der Pufferabgrenzung nach innen). Stellen Sie dabei sicher, daß die Beschriftung „Buffer Dam“ in Richtung der Elektrodenanordnung zeigt.

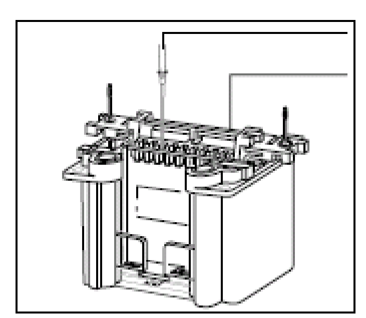


- Lösen die Arretierung der vorderen Öffnung des Klemmrahmens und öffnen Sie diese.



- Halten Sie die Gelkassetten bzw. die Gelkassette und die Pufferabgrenzung gegen die Elektrodenanordnung und schieben Sie die Elektrodenanordnung mit Gelkassette(n) und ggf. mit Pufferabgrenzung in den Klemmrahmen.
- Drücken Sie den äußeren Rand der Elektrodenanordnung herab (nicht die Gele), und sorgen Sie dafür, daß die beiden Rasthebel des Klemmrahmen einrasten, um eine Versiegelung des unteren Randes der Gelkassette(n) zu ermöglichen.





- Drücken Sie den nun so zusammengesetzten, die Gele enthaltenden Klemmrahmen in den Gelbox-Behälter.
- Füllen Sie die innere (obere) Pufferkammer (zwischen den beiden Gelen) mit ca. 150 ml 1×-TGS-Elektrophoresepuffer (Verdünnung beachten!), so daß der Füllstand des Puffers oberhalb der inneren kurzen Streifen liegt und die Streifen so vollständig mit Puffer bedeckt sind.
- Entfernen Sie den Kamm sehr vorsichtig (der die Gelkammern formt) aus der Gelkassette.
- Prüfen Sie auf Undichtigkeiten. Wenn die Anordnung undicht sein sollte, entfernen Sie den zusammengesetzten Klemmrahmen, leeren Sie den Puffer aus, öffnen Sie die Arretierung und drücken sie erneut die Elektrodenanordnung herab, während Sie die Arretierung schließen

- Gießen Sie ca. 200 ml 1×-TGS-Elektrophorese-Puffer (Verdünnung beachten!) in die äußere (untere) Pufferkammer des Behälters, so daß diese ca. 4 cm hoch befüllt ist und den Metallstreifen der inneren Kammer bedeckt.
- Anm.: Wenn eine Undichtigkeit so nicht bereinigt wird, kann man ersatzweise die äußere Kammer bis über die inneren kleinen Streifen befüllen, um so den Füllstand in beiden Kammern abzugleichen. Dazu benötigt man ca. 900 ml 1×-TGS-Elektrophorese-Puffer).

Schritt 3: Beladen der Gelkammern mit den Protein-Proben und Start der Elektrophorese

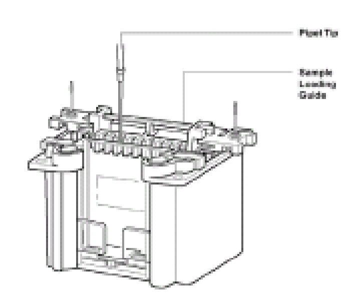
- Plazieren Sie die gelbe Ladeführung oberhalb der Elektrodenanordnung. Die Ladeführung führt die Pipettenspitze in die korrekte Position zur Beladung der jeweiligen Kammer.
- Wenn Sie weniger Proben als freie Kammern haben, halten Sie sich vorrangig an die Kammern in der Mitte des Gels und plazieren sie den KS- und den KM-Standard in je einer randwärtig benachbarten Kammer.

Spur	Volumen	Probe
1	10 µl	KS
2	10 µl	Fischprobe I
3	10 µl	Fischprobe II
4	10 µl	Fischprobe III
5	10 µl	Fischprobe IV
6	10 µl	Fischprobe V
7	10 µl	Fischprobe VI
8	10 µl	Fischprobe VII
9	10 µl	Fischprobe VIII
10	10 µl	AM

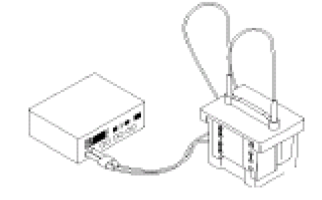
Tabelle 7: Beispiel zu Beladung der Kammern

- Benutzen zum Beladen der Gelkammern möglichst dünne, feine Pipettespitzen.
- Geben Sie langsam je 10 µl jeder Probe und jedes Standards in je eine Gelkammer. Durch höhere Dichte sinkt die Probe unter den Puffer.

- Nachdem Sie alle Proben und Standards in ihre jeweiligen Gelkammern geladen haben, entfernen Sie, so vorhanden, die Ladeführung, und schließen Sie den Deckel.

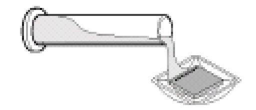


- Schließen sie die Spannungsversorgung richtig gepolt an. Dabei ist das schwarze Kabel (Minus/Masse) ausschließlich in die schwarze Buchse, und das rote Kabel (Plus) ausschließlich in die rote Buchse einzustecken.
- Stellen Sie die Spannung auf 200 V DC ein, starten Sie, und lassen sie die Gelelektrophorese nun ca. 30 Minuten laufen.
- Wenn die Gelelektrophorese vollständig abgelaufen ist, schalten Sie das Gerät ab und trennen Sie es von der Spannungsversorgung ab. Lassen Sie keine potentiell spannungsführenden Teile offen liegen (ziehen Sie alle Kabel ab).



Schritt 3: Sichtbarmachen der Proteinbande durch Einfärben

- Ziehen Sie Handschuhe an, um Kontaminierungen Ihrer Gele zu vermeiden. Vermeiden Sie Kontakt der Gele mit bloßer Haut.
- Leeren Sie den Puffer aus der Elektrodenanordnung. Öffnen Sie die Rasthebel und entfernen Sie die Gelkassetten.
- Legen Sie die Gelkassette flach auf die Arbeitsfläche mit den kurzen Streifen nach oben.
- Schneiden Sie das Klebeband entlang der Seite der Gelkassette auf.
- Trennen Sie vorsichtig die Gelplatten mit einem Spatel oder auch unter Zuhilfenahme Ihrer Fingerspitzen (Handschuhe!). Das Gel bleibt i.d.R. an einer der Platten haften.
- Warum dürfen die Gele nicht mit der Haut in Berührung kommen?
- Legen Sie die Gelplatten in eine Schale mit Leitungswasser, so daß die Flüssigkeit die Ablösung des Gels von der Platte ermöglicht.



- Heben Sie das Gel vorsichtig mit dem Spatel ab.
- Legen Sie das Gel in die Schale mit Leitungswasser und stellen Sie diese für ca. 5 Minuten auf einen automatischen Kipp-Mischer, um Verunreinigungen abzuspülen.



- Gießen Sie das Wasser vorsichtig ab.

- Geben Sie ca. 20 ml „Biosafe Coomassie Blue“ hinzu.
- Lassen Sie den automatischen Kippmischer auf niedriger Stufe min. 1 Stunde laufen, Sie können zur besseren Färbung auch länger laufen lassen.
- Danach werden die Gele über Nacht auf dem automatischen Kippmischer gespült (dabei mind. 2x die Flüssigkeit wechseln).
- Danach werden die Gele entfernt und das Ergebnis als Grafikdatei eingescannt.

C: Interpretation einzelner Bande

- Lassen Sie sich im Anschluß daran die Bilddatei für Ihr Protokoll aushändigen und kommentieren Sie in Ihrem Protokoll, was zu sehen ist (Proteinbande, s.u.).

Bestimmung von Molekulargewichten der Proteine

- Sehen Sie sich das im Folgenden abgebildete Beispiel-Gel an:
- Proteine bekannter Größen wurden parallel zu 5 verschiedenen Proben Fischmuskelextrakt einer Gelelektrophorese unterzogen.
- Die Fischmuskelextrakte sind komplexe Mischungen verschiedenster unbekannter Proteine.
- Indem man die Wanderungsentfernung (entspricht bei gleicher Zeit der Wanderungsgeschwindigkeit) der unbekannten Proteine mit einer Reihe bekannter Proteinstandards (mit bekannten Molekulargewichten) vergleicht, kann man die Masse des Proteins schätzen.
- Die genaue Identifizierung eines bestimmten Proteins ist so allerdings nicht möglich.

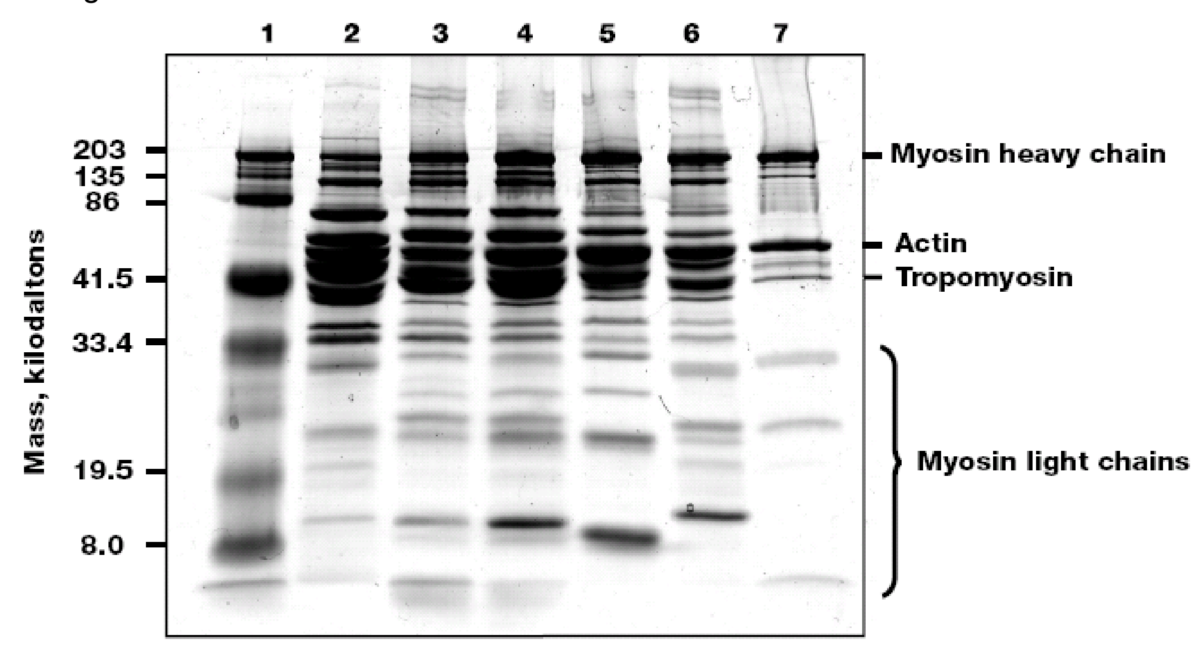


Abbildung 9: Protein-Standards und Fisch-Extrakte wurden in einem 15%igen Polyacrylamid-Gel 30 Minuten bei 200 V einer Elektrophorese unterzogen und mit biosicherem Coomassie-Blau gefärbt.

Konstruieren Sie Ihre Standard-Kurve:

- Um das Molekulargewicht der unbekannten Proteine zu bestimmen, konstruieren sie zunächst eine Wanderungseschwindindigkeits-Masse-Standardkurve der bekannten Proteine des von Ihnen verwendeten Standards (KS):
- Tragen Sie Wanderungsgeschwindigkeit der bekannten Proteinmarker auf die X-Achse und deren Molekulargewichte logarithmisch auf die Y-Achse auf.
- Benutzen Sie hierfür semilogarithmisches Papier.
- Durch die logarithmische Auftragung ergibt die resultierende Kurve im Mittel eine Gerade, ähnlich wie in untenstehender Abbildung zum Vergleich zu sehen ist.
- Ausgehend von der Standard-Kurve kann das Molekulargewicht eines unbekannten Proteins abgeschätzt werden:

- Zuerst mißt man die Wanderungsentfernung einer Proteinbande vom Kammerboden bis zum unteren Rand der Bande.
- Diesen Wert markiert man auf der X-Achse und projiziert von diesem Wert ausgehend vertikal eine Linie auf die Standard-Kurve. Projizieren Sie vom Kreuzungspunkt dieser Linie mit der Kurve eine weitere Linie horizontal auf die Y-Achse und lesen Sie dort das dem Protein zugehörige Molekulargewicht ab.
- Ermitteln Sie auf diese Weise nun das Molekulargewicht von Aktin und Myosin anhand der AM-Kontroll-Spur Ihres Gels.

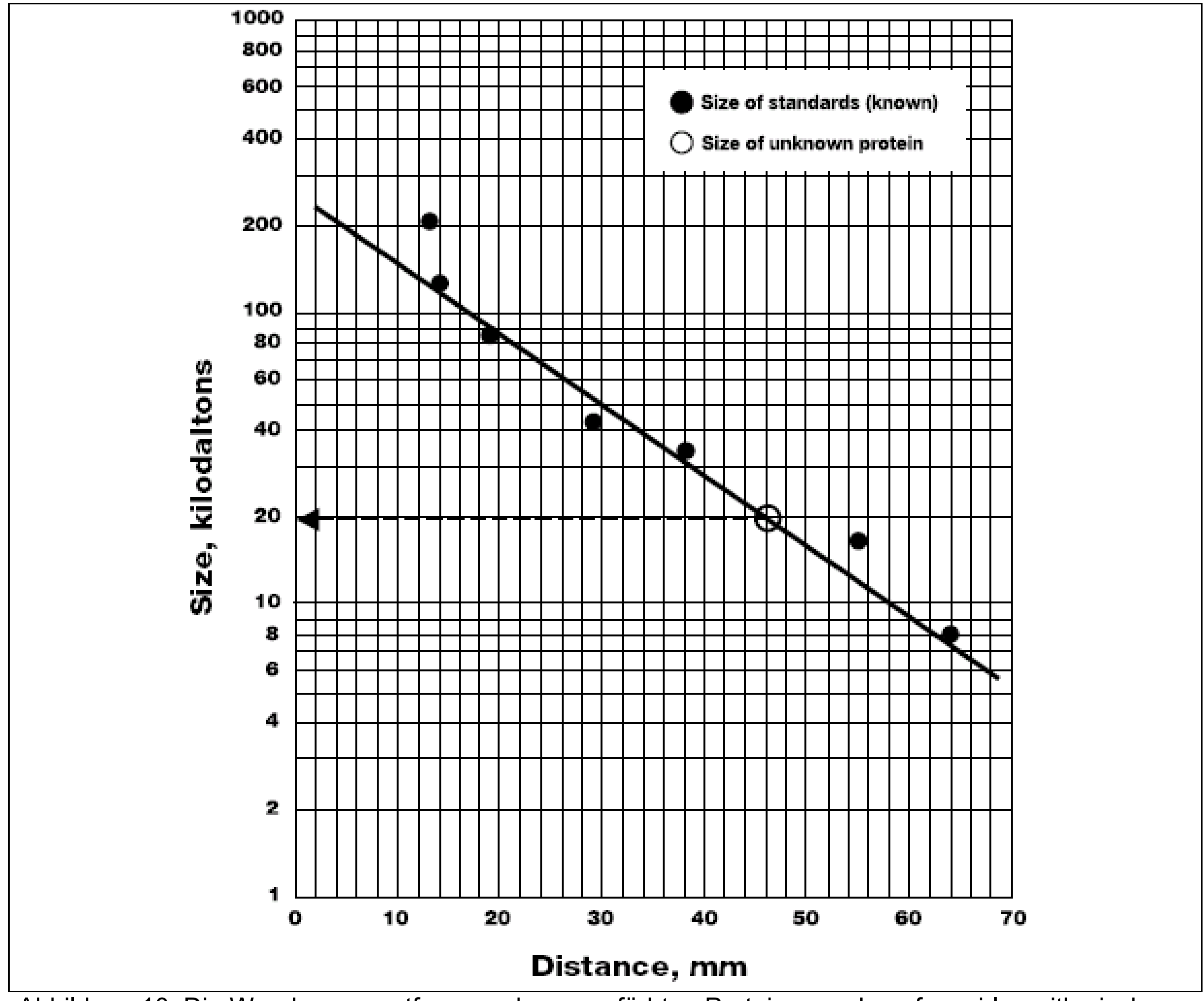


Abbildung 10: Die Wanderungsentfernung der vorgefärbten Proteine wurde auf semi-logarithmischem Papier gegen die Proteingröße aufgetragen, um so eine Standardkurve für das Gel zu erzeugen.

- Informieren Sie sich über die Einheit Dalton, die in der Biologie traditionell für das Molekulargewicht verwendet wird.
- Nachdem dem Sie die Abschätzung der Molekulargewichte von Aktin und Myosin vorgenommen haben, treffen Sie für Ihr Protokoll eine Aussage über die Anzahl an Aminosäuren in Aktin. Gehen Sie hierzu von einem mittleren Molekulargewicht von 110 Dalton pro Aminosäure aus.
- Treffen Sie für Ihr Protokoll eine Aussage darüber, wieviele DNA-Basenpaare das Gen enthält, das Aktin kodiert.
- Im Vergleich haben DNA-Basenpaare übrigens ein mittleres Molekulargewicht von ca. 660 Dalton.

3 Versuchstag 3: Nucleotide und Nucleinsäuren (Altskript 2.5)

3.1 Platz 1

3.1.1 DNA-Analyse

3.1.1.FF Versuch: DNA-Fingerprinting (VB4, Altskript V 2.27)

Biotechnologie-Forscher-DNA-Fingerprinting Kit (Best.-Nr. 166-0007EDU www.bio-rad.com)

Verdauungs-Prozeß der DNA-Proben mittels Restriktionsenzymen:

Die dreidimensionale Struktur von Restriktionsenzyme erlaubt es ihnen, sich an eine doppelsträngiges DNA-Molekül zu binden und an der Helix entlangzugleiten, bis sie eine spezifische Basenpaarsequenz erkennen, die das Enzym anhalten läßt. An dieser Stelle, die Restriktions(schnitt)stelle genannt wird, verdauen (spalten chemisch) die Enzyme dann das DNA-Molekül.

Vorbereitung

- Informieren Sie sich genauer über die Enzymklasse „Restrikitions-Endonukleasen“
- Zwei häufige Restriktionsendonukleasen sind *EcoRI* und *PstI*, die Sie in diesem Experiment erhalten.
- Recherchieren Sie zum besseren Verständnis von EcoRI und PstI im DNA-Fingerprinting-Test für Ihr Protokoll, wie genau der Schneideeffekt der Restriktionsendonukleasen an der DNA wirkt.
- Die durch die Basenpaare gezogene Linie repräsentiert die Stellen, an denen Bindungen gespalten werden, wenn eine Restriktionsendonuklease die entsprechende Erkennungssequenz erkennt, im folgenden Beispiel ist diese Erkennungssequenz „GAATTC“. Betrachten Sie die beiden unten gezeigten DNA-Proben (der Einfachheit halber sind nur Einzelstränge abgebildet):
  Probe Nr.1: C A G T G A T C T C G A A T T C G C T A G T A A C G T T
  Probe Nr.2: T C A T G A A T T C C T G G A A T C A G C A A A T G C A
- Welche Sequenz zeigt der komplementäre Strang? Wo wird dieser geschnitten?
- Geben Sie für den Fall, daß beide Sequenzen mit einem Restriktionsenzym mit der Erkennungssequenz GAATTC behandelt werden, die Anzahl und Größe der sich ergebenden Fragmente an.

Experimenteller Teil

Im Labor erhält Ihre Gruppe 6 DNA-Proben. Die Aufgabe besteht darin, herauszufinden, ob eine davon vom gleichen Individuum kommt, oder ob sie von verschiedenen Individuen stammen.

- Nehmen Sie die Flipdeckel-Mikro-Probenröhrchen zur Hand. Lassen Sie dabei eine Reihe dieser Gefäße zunächst an den Kunststoffstegen zusammen (trennen Sie die einzelnen Gefäße noch nicht, am Stück sind die Gefäße vorerst handlicher).
- Markieren Sie den Deckel des ersten Gefäßes mit einem wasserfesten Stift mit Ihrer Gruppennummer. Stellen dabei sicher, daß Ihr Kürzel von keiner anderen Gruppe ebenfalls benutzt wird.
- Kennzeichnen Sie die Reaktionsgefäße *auf den Deckeln* so, daß Sie sie später eindeutig zuordnen können.
- Tragen Sie Handschuhe und benutzen Sie unbedingt für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze! Arbeiten Sie sauber und sorgfältig und vermeiden Sie jede Verunreinigung Ihrer Proben. Vermeiden sie insbesondere jeden Kontakt mit den Deckelinnenseiten der Flipdeckel-Gefäße
- Es ist im Vorfeld des Versuches erforderlich, je 10 µl jeder DNA-Probe in jedes entsprechend gekennzeichnete und gefärbte Reaktionsgefäß zu pipettieren, dies wird i.d.R. bereits im Vorfeld von Ihrem Dozenten ausgeführt.
- Sie erhalten daher von Ihren Betreuern eine Reihe Flipdeckel-Mikrogefäßen mit folgendem Inhalt, von links nach rechts gesehen (mit dem Deckelscharnier auf der Ihnen abgewandten Seite, also hinten rechts):
  TO V1 V2 V3 V4 V5 M FM ENZ

Gefäß-Nr. (von links nach rechts)	Inhalt
I.	V1 – Tatverdächtiger Nr. 1 (10 µl)
II	V2 – Tatverdächtiger Nr. 2 (10 µl)
III.	V3 – Tatverdächtiger Nr. 3 (10 µl)
IV.	V4 – Tatverdächtiger Nr. 4 (10 µl)
V.	V5 – Tatverdächtiger Nr. 5 (10 µl)
VI.	TO – Tatort-DNA (10 µl)
VII.	M – Lambda-HIND-III-Größenmarker (20 µl)
VIII.	FM – Frontmarker (70 µl)
IX.	ENZ – EcoRI/PstI-Enzymmischung (80 µl)

- Der Restriktions-Verdauungsprozeß wird im Folgenden in diesen Gefäßen stattfinden. Behalten Sie daher diese Gefäße auf Ihrem Arbeitsplatz.
- Nehmen Sie Ihre DNA-Proben und das Reaktionsgefäß mit der Enzymmischung „ENZ“ zur Hand.
- Geben Sie nun zu jeder zu analysierenden Probe, also zu TO und V1 bis V5 mit je 1 neuen Pipettenspitze je 10 µl der Enzymmischung ENZ hinzu (es wird KEIN ENZ zu den anderen beiden Proben M bzw. FM gegeben). Lassen Sie sich von Ihrem Betreuer zeigen, wie man mithilfe einer Kolbenpipette korrekt einmischt. Achten Sie darauf, das zu pipettierende Volumen im unteren Bereich des Probengefäßes zu plazieren (es sollte nicht im oberen Bereich an der Gefäßwand haften bleiben).
- Schließen Sie die Flipdeckel fest.
- Stellen Sie die Mikro-Probenröhrchchen für einige Sekunden in die Mikrozentrifuge, um ggf. an der Gefäßwand haftende Substanzen nach untern zu drücken. Die Reaktionsgefäße müssen symmetrisch gegeneinander **austariert** in den Rotor positioniert werden (sonst entsteht eine für das Gerät schädliche Unwucht; Ist keine Zentrifuge verfügbar, schlagen Sie die Reaktionsgefäße wie ein Thermometer nach unten aus).

- Sorgen Sie dann für eine gute Durchmischung des Inhalts (mit dem Finger dagegen schnippen, einige Male wenden, oder mithilfe eines elektrischen Schüttlers).
- Zentrifugieren Sie erneut
- Inkubieren Sie die Proben, indem Sie die Reaktionsgefäße in einen schwimmenden Reaktionsgefäßständer setzen und mindestens 45 Minuten in 37°C warmen Heizblock (oder ersatzweise ein warmes Wasserbad, falls kein Heizblock zur Verfügung steht).
- Bewahren Sie die Proben danach gekühlt auf.

DNA- Gelelektrophorese in Agarose

Die DNA-Fragmente werden nun durch Elektrophorese nach ihrer relativen Größe getrennt. Die DNA-Fragmente werden hierzu in ein Agarose Trenngel geladen, das in eine Kammer kommt, die mit einer elektrisch leitenden Pufferlösung gefüllt ist. Zwischen zwei Drahtelektroden an den beiden Enden der Kammer wird Gleichstrom angelegt. DNA-Fragmente sind negativ geladen und werden daher im elektrischen Feld vom positiven Pol angezogen. Die Matrix des Agarosegels dient dabei als molekulares Sieb, durch das kürzere DNA-Fragmente leichter hindurchwandern können, als größere. Pro Zeiteinheit wandern kleinere Fragmente somit weiter als größere. Fragmente der gleichen Größe bleiben zusammen und wandern in separaten DNA-Banden.

Elektrophorese der DNA-Proben

- Gießen Sie 1%ige Agarose-Gele wie folgt:
- Geben Sie dazu pro Gel je 50ml 1×TAE-Puffer (wie wird dieser hergestellt?) in einen 100ml Erlenmeyer-Kolben. Geben Sie dorthinein eine entsprechende Menge Agarose, um die gewünschte Konzentration (hier: w= 1%) zu erreichen.
- Decken Sie die Öffnung des Erlenmeyer-Kolbens mit einem kleinen Becherglas ab, so daß beim späteren Erhitzen keine Flüssigkeit herausspritzen kann. Stellen Sie den abgedeckten Erlenmeyerkolben dann in ein großes Becherglas, so daß etwaige Flüssigkeitstropfen an seiner Außenseite beim späteren Erhitzen nicht in den Mikrowellenherd laufen können.
- Lösen Sie nun die Agarose in dem Puffer durch vorsichtiges Erhitzen in der Mikrowelle (1 bis 1,5 min auf Stufe 6).
- Stellen Sie mithilfe einer Wasserwaage den Gelträger auf Ihrem Arbeitstisch exakt waagrecht auf, setzen Sie metallenen Endplatten und den Probenkamm ein.
- Gießen Sie zunächst nur wenige Milliliter der gelösten Agarose ein und dichten Sie durch Kippen die Endplatten ab. Warten Sie, bis die Gele abgekühlt sind.
- Füllen Sie dann die restliche Lösung ein (Gelhöhe ca. 6mm).
- Lassen Sie die Gele vollständig abkühlen und erstarren, bevor Sie das Gerät bewegen.

Nehmen Sie nun Ihre mit ENZ vermengten DNA-Proben zur Hand und mischen Sie mit einer Mikro-Kolbenpipette in jedes Reaktionsgefäß je 5 µl der Frontmarkerlösung „FM“ ein, wobei Sie für jede Probe eine frische Pipettenspitze verwenden.

- Schließen Sie die Flipdeckel fest.
- Stellen Sie die Mikro-Probenröhrchchen für einige Sekunden austariert in die Mikrozentrifuge.
- Sorgen Sie dann für eine gute Durchmischung des Inhalts (anschnippen).
- Zentrifugieren Sie erneut.
- Setzen Sie den Gelträger mit dem darin fest gewordenen Gel auf die Plattform in der Elektrophoresekammer. Die Geltaschen kommen dabei ans Kathodenende (Minuspol) der Kammer mit dem schwarzen Anschlußkabel.
- Überlegen sie wie und aus welchem Grund die entsprechende Polung erfolgen muß. Welche Wanderungsrichtung haben die Partikel in ihrem Gel.
- Ziehen Sie die Endplatten ab und entfernen Sie ganz vorsichtig den Gelkamm, indem Sie ihn gerade nach oben abziehen.
- Gießen Sie soviel Elektrophoresepuffer in die Elektrophoresekammer, daß die Geltaschen knapp bedeckt sind (ca. 275 ml), keinesfalls höher als die Füllstandsmaximum-Markierung an der Außenseite der Anordnung.
- Üblicherweise werden Gele von links nach rechts gelesen. Die erste Probe wird also normalerweise in der Geltasche in der linken Ecke des Gels aufgetragen.
- Vergewissern Sie sich bei Ihrem Betreuer, daß in dem von Ihnen verwendeten Gel wie unten beschrieben ein Probenvolumen von 20 µl Platz findet. Sollten Sie andere Geltaschen verwenden, passen Sie das Volumen entsprechend an.
- Beladen Sie nun mithilfe von schmalen, feinen Pipettenspitzen (für jede Probe eine neue Spitze) die erste Gelkammer mit dem Größenmarker, die zweite Gelkammer mit der TO-Probe, und die dritte bis siebte mit den Proben V1 bis V5.
- Führen Sie die Pipettenspitze senkrecht ca. 2mm in die Kammer ein. Stechen Sie nicht in das Gel, da die Spitze dann leicht verstopft wird.
- Hantieren Sie dabei vorsichtig mit der Pipettenspitze: Verletzen Sie die Wandungen der Gelkammern nicht, achten Sie darauf, daß kein Probeninhalt außerhalb der Gelkammer landet.
- Das Gel sollte nun wie folgt beladen sein.

Bahn	Inhalt	Menge
1	V1	20 µl
2	V2	20 µl
3	V3	20 µl
4	V4	20 µl
5	V5	20 µl
6	TO	20 µl
7	M	20 µl

- Setzen Sie den Deckel auf die Elektrophoresekammer. Der Deckel paßt nur in einer Orientierung auf das Unterteil: Rot gehört zu rot, schwarz zu schwarz.
- Verbinden Sie die Elektroden polrichtig mit dem Netzgerät.
- Schalten Sie das Netzgerät ein.
- Stellen Sie die Spannung auf 100 V ein und lassen Sie die Elektrophorese 30 bis 40 Minuten lang laufen.
- Achten Sie darauf, die Zeit nicht so zu überschreiten, daß die gefärbten Partikel über das Gel hinausgetrieben werden.

Sichtbarmachen der DNA-Fragmente durch Anfärbung der DNA mit Fast Blast DNA-Färbung

Ohne weitere Hilfsmittel sind auf den Gelen nur die Positionen der Frontmarker, nicht aber die der DNA-Fragmente zu erkennen. Die DNA-Fragmente werden durch Anfärben des Gels mit einem blauen Farbstoff sichtbar gemacht. Die blauen Farbstoffmoleküle haben eine hohe Affinität zur DNA, d.h. sie binden sehr fest an die DNA-Fragmente, so daß diese dadurch sichtbar werden. Die sichtbaren DNA-Fragmente können anschließend photographiert oder eingescannt werden, oder die Gele können in getrockneter Form zur Analyse aufgehoben werden.

Gel-Färbe- und Entfärbungsschritte

Es gibt zwei verschiedene Protokolle, um DNA mit der Fast Blast Färbung sichtbar zu machen, ein schnelles und eine langsames. Da bei der Schnellfärbung zwar innerhalb von 12-15 Minuten eine Färbung eintritt, das Ergebnis aber häufig optisch undeutlich ist, verwenden Sie hier die langsame Färbung über Nacht.
Ihr Dozent nimmt die Gele dann am folgenden Tag aus der Färbeschale, spült und wäscht sie aus und scannt die Ergebnisse als Bilddatei für Sie ein.
Tragen Sie Handschuhe und Kittel, um eine Anfärbung der Hände und der Kleidung zu vermeiden.

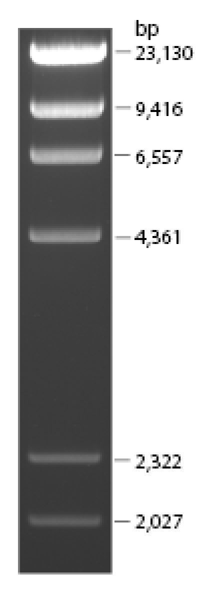
Färbung über Nacht in 1x Fast Blast DNA-Färbelösung

- Verdünnen Sie die Fast Blast DNA-Färbelösung (500x) auf eine 1x Konzentration.
- Stellen Sie dabei in Rücksprache mit Ihrem Betreuer eine ausreichende Menge für alle Teilnehmer des Versuchstages her (insg. ca. 300 ml).
- Kennzeichnen Sie die Färbeschalen mit einem Kürzel Ihrer Gruppe.
- Zum Anfärben wird das Gel vorsichtig aus dem Gelträger genommen. Dies geht leicht, indem Sie mit einer Hand das untere Ende des Gels halten, während sie mit der anderen Hand das Gel vorsichtig mit dem Daumen herausdrücken. Besondere Aufmerksamkeit muß der Unterstützung des Gelteils gewidmet werden, der die Starttaschen enthält, da das Gel leicht der Startlinie entlang bricht.
- Färbung der Gele: Lassen Sie die Gele vom Gelträger in die Färbeschale gleiten. In jeder Schale werde zwei Gele gefärbt. Legen Sie die Gele in eine Färbeschale und bedecken Sie sie soweit mit Färbelösung, daß die Färbeschale auch auf dem automatischen Kipp-Schütteltisch nicht überlaufen kann.
- Bewegen Sie die Färbeschale mit dem Gel einige Male zu Beginn der Färbung.
- Stellen Sie die Färbeschale auf einen automatischen Kipp-Schüttler und bewegen die Schale mit dem Schüttler über Nacht.
- Nach ca. 2 Stunden soll man die ersten Bande sehen, nach ca. 8 Stunden ist die Färbung abgeschlossen.

Quantitative Analyse der als Bandenmuster visualisierten DNA-Fragmente

- Für einen genauen Vergleich zwischen der DNA vom Tatort und der DNA des Tatverdächtigen kann man sich nicht nur auf eine Übereinstimmung nach Augenmaß verlassen, sondern man muß die Fragmentgröße quantitativ bestimmen.
- Messen Sie mit einem Lineal die Wanderungsstrecke jeder einzelnen Bande in Millimetern, von der Unterkante der Starttasche bis zur Mitte der entsprechenden Bande.

- Fertigen Sie für Ihr Protokoll eine Tabelle der gemessenen Wanderungsstrecken an.
- Erstellen Sie aus den Wanderungs-Daten des FM-Größenmarkers eine Standard-Kurve in halblogarithmischer Darstellung. Tragen Sie dabei auf die X-Achse die Wanderungsstrecken auf und die Fragmentgrößendaten des FM-Markers logarithmisch auf die Y-Achse.
- Tragen Sie für die Banden 2-6 die Abstände in Abhängigkeit von der Größe sowohl auf linear (z.B. auf Millimeterpapier) als auch auf halblogarithmisches (z.B. auf halblogarithmisches Papier) auf. Verbinden Sie (z.B. mit Hilfe eines Lineals) auf allen Diagrammen die Datenpunkte mit einer Linie. Verlängern Sie die Linie bis zur rechten Seite des Diagramms.



- Entscheiden Sie, welches Diagramm – das lineare oder das halblogarithmische – zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen der Tatort-DNA und der Tatverdächtigen-DNA verwendet werden soll. Begründen Sie Ihre Wahl in Ihrem Protokoll.
- Bestimmen Sie zur Abschätzung der Größe eines unbekannten Tatort- oder Tatverdächtigen-Fragments die Wanderungsstrecke, die das Fragment zurückgelegt hat.
- Tragen Sie diesen Punkt auf der X-Achse der Standardkurve ein.
- Projizieren Sie von diesem Punkt auf der X-Achse eine Senkrechte bis zur Standardkurve, und von dort eine Waagrechte bis zur Y-Achse (z.B. mit dünnen Bleistiftstrichen. Dort, wo die Waagrechte die Y-Achse schneidet, kann die ungefähre Größe des unbekannten DNA-Fragments abgelesen werden.
- Verfahren Sie entsprechend für alle DNA-Fragmente vom Tatort und von den Verdächtigen.
- Vergleichen Sie die Fragmentgrößen der DNA vom Tatort mit denen der Tatverdächtigen.
- Ermitteln Sie für Ihr Protokoll, ob die Fragmentgrößen der DNA irgendeines Tatverdächtigen mit denen der DNA vom Tatort übereinstimmen.
- Wie sicher sind Sie, daß hier eine Übereinstimmung vorliegt? Begründen Sie dies in Ihrem Protokoll.

Beispiel: Nehmen wir einmal an, die Bande Nr. 2 des Tatverdächtigen Nr. 5 sei 24 mm gewandert. Gehen Sie von der 24-mm-Marke auf der X-Achse senkrecht nach oben zur Standardkurve und markieren Sie die Schnittstelle mit der Standardkurve. Zeichnen Sie durch diese Schnittstelle eine Waagrechte bis zur Y-Achse, dieser Wert entspricht der ungefähren Größe des Fragments. Bande 2 des Tatverdächtigen 5 könnte so ungefähr die Größe von 2000 Bp aufweisen.

3.2 *Platz 2*

3.2.1 DNA-Vergleich

3.2.1.GG Teilversuch: BioRad Crime Scene Investigator Kit

(VB3, Altskript V 2.26)

Crime Scene Investigator PCR Basics™ Kit Catalog #166-2600EDU explorer.bio-rad.com

Teil 1 *(wird durchgeführt an Versuchstag 3)*

- Recherchieren Sie im Vorfeld was eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist, und wie diese funktioniert, insb. in punkto für die Reaktion geeigneter Temperatur.
- Informieren Sie sich über die wichtigsten Englisch-Vokabeln in punkto Genetik und lesen Sie folgende Informationen. Biomedizinische Publikationen sind heutzutage in aller Regel auf Englisch, von daher ist dies seitens Ihres Dozenten ausdrücklich erwünscht.

What kinds of human DNA sequences are used in crime scene investigations?
There are ~3 billion base-pairs in the human genome – greater than 99.5% do not vary between different human beings. However, a small percentage of the human DNA sequence (<0.5%) does differ, and these are the special **polymorphic** ("many forms") sequences used in forensic applications. By universal agreement, DNA sequences used for forensic profiling are "anonymous"; that is, they come from regions of our chromosomes (also called **loci**) that do not control any known traits and have no known functions. Loci are basically genetic addresses or locations. A single **locus** may have different forms or types; these different forms are called **alleles**. A locus may be bi-allelic, having only two different forms, or it may be polymorphic, as described above. The DNA sequences used in forensic labs are non-coding regions that contain segments of **Short Tandem Repeats** or **STRs**. STRs are very short DNA sequences that are repeated in direct head-to-tail fashion. The example below shows a locus (known as TH01) found on chromosome 11; its specific DNA sequence contains four repeats of [TCAT].

..C C C T C A T T C A T T C A T T C A T T C A..

Abbildung 11

For the TH01-STR locus, there are many alternate polymorphic alleles that differ from each other by the number of [TCAT] repeats present in the sequence. Although more than 20 different alleles of TH01 have been discovered in people worldwide, each of us still has only two of these, one inherited from our mother and one inherited from our father. For example as shown in Abbildung 12, suspect A has one allele with 6 repeats, and one allele with 3 repeats, giving a DNA profile for the TH01 locus of 6-3. Suspect A's DNA type for the TH01 locus is (5'–3') Suspect B's DNA type for TH01 locus is (6'–10')

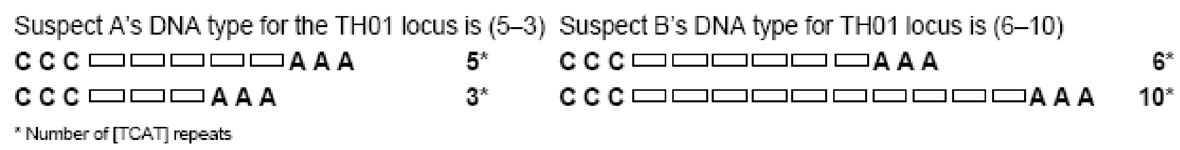


Abbildung 12: Two sample TH01 genotypes.

How are STR alleles detected?

The key to DNA profiling is amplification of the copies present in the small amounts of evidentiary DNA by **polymerase chain reaction (PCR)**. Using primers specific to the DNA sequences on either side of the [TCAT]-STR, billions of copies of each of the two original TH01 alleles in any one person's DNA type are synthesized in the reaction. These copies contain the same number of STRs present in the original DNA copies and can be visualized using agarose gel electrophoresis. By comparison with a DNA size standard, or allele ladder, that corresponds to the known sizes of TH01 alleles, the exact sizes of the PCR products from the sample DNAs can be determined and compared. A diagram of the results for TH01 typing of Suspect A and Suspect B is shown in Abbildung 12. In this cartoon example, PCR has been performed on DNA from 2 suspects using primers specific for the TH01 locus. Following gel electrophoresis which separates the PCR products according to their size, the pattern of bands is compared to the Allele Ladder to identify the alleles present in the original samples.

PCR Amplification

PCR amplification is DNA replication in a test tube. The portion of the DNA you want to make copies of is called the target sequence. The sample of DNA obtained at a crime scene and the suspect's DNA samples contain the target sequence.

PCR relies on three principles of molecular biology:

1.) Denaturation - melting double stranded DNA template into single stands
2.) Annealing - complementary DNA strand hybridization via DNA primers
3.) Extension - DNA strand synthesis via DNA polymerase

Denaturation:

Before new DNA synthesis can begin the double stranded DNA template must be unwound and separated into single strands. In cells this is carried out by a family of enzymes. In PCR, heat is used to melt apart – or **denature** – the double stranded DNA template.

Annealing:

Before a target region of DNA can be amplified, one must determine short sequences of DNA upstream (at the 5' end) and downstream (at the 3' end) of the target loci region of interest. These areas are then used to make short pieces of DNA, called primers or oligonucleotides, which are complementary to regions upstream and downstream of the target loci region (Abbildung 13). Primers serve as start and stop points for amplifying the target region of the DNA to be copied.

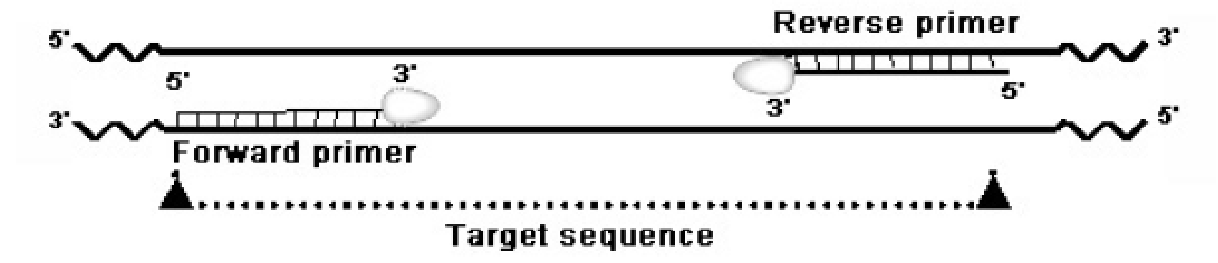


Abbildung 13: Primers annealed to a target DNA sequence during PCR.

In PCR, complementary strand hybridization takes place when oligonucleotide primers anneal, or bind, to their respective complementary base pair sequences on the template. Hybridization is the process that describes the binding of the oligonucleotide primer to the template DNA. The two strands anneal to each other, forming a 'hybrid'. Like bookends, the two primers are designed and synthesized in the laboratory with a specific sequence of nucleotides so they will anneal at the opposite ends and on the opposite strands bracketing the target stretch of double-stranded DNA (template strand) to be amplified. Therefore, the target sequence is determined by the location that the primers anneal to.

Extension.

Primers are needed because the **DNA polymerase** requires an already existing nucleotide chain to bind and add nucleotides to one at a time. Once the polymerase locates and binds to template DNA and the primer, it initiates the addition of nucleotides and synthesizes new copies of the double stranded template DNA by adding nucleotides onto the primer and extending it. Therefore, primers provide a starting point for the DNA polymerase.

These 3 steps – denaturation, annealing, and extension together make up one PCR cycle. A complete PCR reaction involves many repetitious of a single PCR cycle. In this experiment, your PCR reactions will cycle 35 times.

The enzyme **DNA polymerase** which is used in PCR must be thermally stable because PCR cycles between temperatures of 52°C and 94°C. The thermostable DNA polymerase that performs the polymerization was isolated from a thermophilic bacterium, Thermus aquaticus (Taq), which lives in high-temperature steam vents such as those found in Yellowstone National Park.
Two template strands are created from the original template after each complete cycle of the strand synthesis reaction – denaturation, annealing, and extension. It is called the polymerase chain reaction because exponential growth of the number of template molecules occurs after each cycle is complete, i.e., the number of DNA copies doubles at each cycle. Therefore, after 35 cycles there will be $2^{\wedge 35}$times (that is 34.359.738.368 times) more copies than at the beginning. After 35 cycles, the DNA of interest has been amplified sufficiently to be visualized using gel electrophoresis and DNA stains. This allows researchers to determine the presence or absence of the desired PCR products. In order for PCR to happen efficiently, several components are needed. In addition to the template, the oligonucleotide primers, and the enzyme (Taq DNA polymerase), a special reaction buffer is also required, called a **master mix**. The master mix contains all of the components for PCR to occur, including the individual building blocks of DNA (nucleotides, or dNTPs), a special buffer to maintain optimum pH, salts, and $MgCl_2$. Salts and magnesium ions (also known as cofactors) are needed for the Taq-DNA-polymerase to perform optimally. In this experiment, your instructor will provide you with a master mix that comes prepared with all of the ingredients listed above, but also includes coloured primers and Taq-polymerase mixed in. For this reason, it's important to keep the master mix cold before use, so that the enzyme doesn't start to work before you add your DNA templates. In this part of the experiment, you will obtain DNA samples which have been collected from a crime scene and four individuals suspected of being involved in the crime. Your task is to amplify the region of interest (the BXP007 locus, a polymorphic allele) from the DNA samples. Once complete, you will analyze your PCR products using gel electrophoresis to determine the genotypes of the samples at the BXP007 locus and match the crime scene DNA to one of the suspects.

Electrophoresis of PCR Products

Since DNA is negatively charged, it can be separated using an electric current. In fact, electrophoresis means "carry with current". In agarose gel electrophoresis, DNA is placed in solidified agarose, which forms sieves containing pores that vary in size depending on the concentration of the agarose. The higher the concentration of agarose, the smaller the pore size, and the longer it takes for larger molecules to move through. This is particularly useful when you want to compare DNA molecules of different sizes contained in the same sample. Movement through the gel occurs when an electric current is applied across the gel. Since the gel is immersed in buffer, the current will travel through the buffer and gel, carrying the negatively charged DNA with it toward the positive anode.
In addition to your PCR products, you will also be running a DNA Allele Ladder that represents all of the possible alleles at the BXP007 locus. This is a reference, or marker, that you can compare your PCR reactions to so you can judge their relative sizes and their identities. In the following drawing of a gel, the samples, or bands, seen in the first track, or lane, all come from the BXP007 Allele Ladder. These are the standard sizes of all the alleles know to occur at this locus. There are 8 possible alleles, with the largest at the top of the gel and the smallest at the bottom. The sizes are, from top to bottom, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, and 100 base pairs (bps). Allele names are indicated in the figure. In the next several lanes, we see PCR products that come from DNA samples that have been tested for what alleles they carry at this particular locus. As shown in figure 12, the sample in the lane next to the Allele Ladder, the Crime Scene Sample (CS) has a genotype that corresponds to alleles 5 and 2 on the allele ladder. We would say that the genotype for this sample is 5-2. For the next sample, the genotype would be 7-4, and so on.

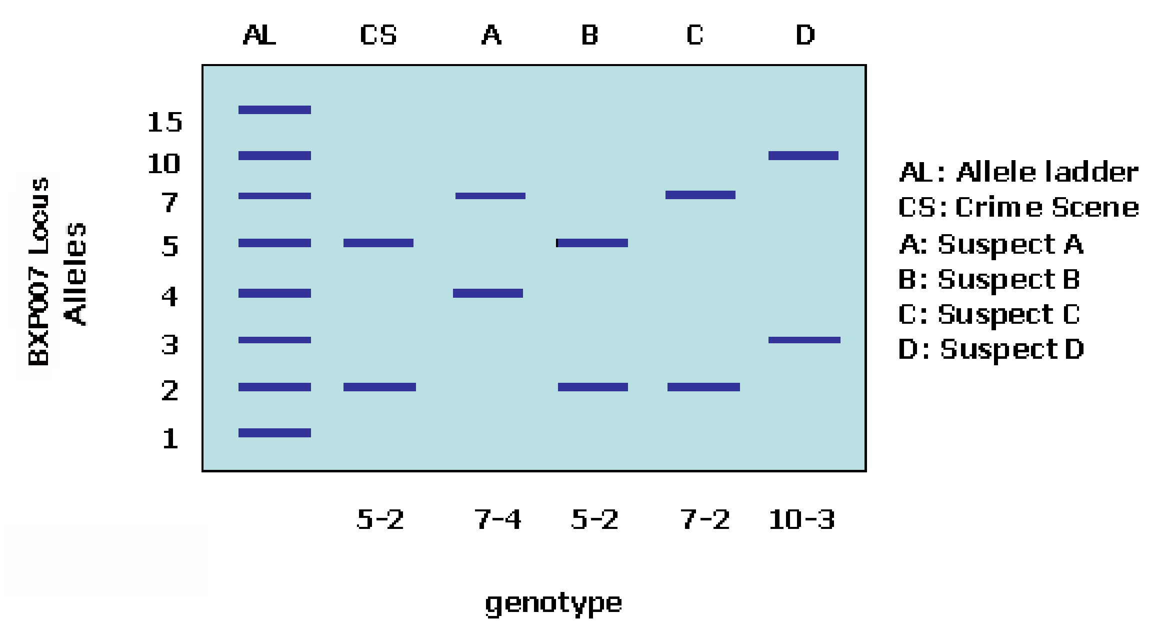


Abbildung 14: A cartoon of potential Crime Scene Investigator PCR Basics kit results at the BXP007 locus.

An Ihrem Platz sollten vorhanden sein:
6 Mikroflipdeckelgefäße in Schaumstoff auf Eis gelagert:
- 1 Mikroflipdeckelgefäß beschriftet mit MMP (MasterMix+Primer)
- 5 Mikroflipdeckelgefäße beschriftet mit CS (Crime Scene) sowie A, B, C, and D.

PCR tubes labelled	**DNA templates**	**MasterMix+Primers (blue liquid)**
CS (+initials)	20 µl Crime Scene DNA	20 µl MMP
A (+initials)	20 µl Suspect A DNA	20 µl MMP
B (+initials)	20 µl Suspect A DNA	20 µl MMP
C (+initials)	20 µl Suspect A DNA	20 µl MMP
D (+initials)	20 µl Suspect A DNA	20 µl MMP

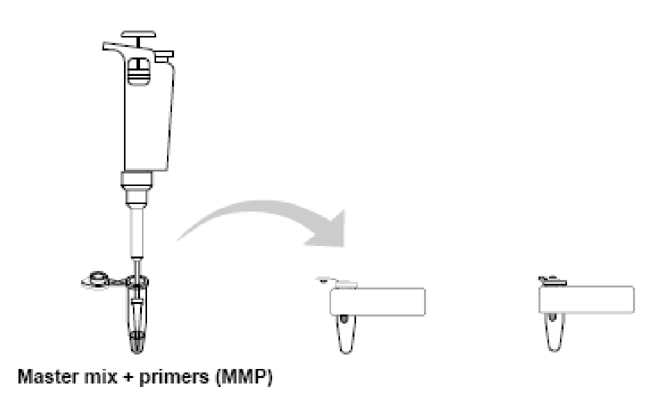
PCR tube

Capless tube

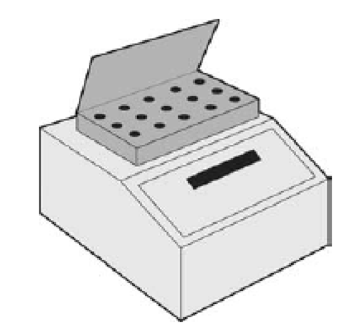
Vorgehen:

- Kennzeichnen Sie die Gefäße so, daß Sie Ihre Gefäße eindeutig zuordnen können und nicht mit den Gefäßen einer anderen Gruppe verwechseln können.
- Lagern Sie die Gefäße kühl, d.h. solange Sie auf der Werkbank verwendet werden, sollten sie auf Eis gelagert werden.
- Tragen Sie Handschuhe und benutzen Sie unbedingt für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze! Arbeiten Sie sauber und sorgfältig und vermeiden Sie jede Verunreinigung Ihrer Proben. Vermeiden sie insbesondere jeden Kontakt mit den Deckelinnenseiten der Flipdeckel-Gefäße
- Wenn möglich, verwenden Sie 20 µl Kolbenpipetten und Pipettenspitzen mit Luftfilter.
- Achten Sie sorgfältig darauf, für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze zu verwenden.
- Stellen Sie sicher, daß Ihre Tatort-DNA-Probe und Ihre Verdächtigen-DNA sich in Mikrogefäßen befinden, die in Ihren Thermocycler passen.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, woraus der Mastermix und der Primer bestehen.
- Geben Sie zu jeder Probe (Pipettenspitzenwechsel!) je 20 µl des MasterMix+Primer.
- Nutzen Sie die Pipette durch vorsichtiges Wiederansaugen und Wiederauswerfen zum Durchmischen des Gefäßinhaltes. Achten Sie beim Einpipettieren darauf, den Inhalt nah am Gefäßboden auszuwerfen (er sollte nicht am oberen Gefäßrand kleben bleiben).
- Schließen Sie die Gefäßdeckel fest.

- Lagern Sie die Gefäße (mit DNA und MMP) auf Eis zwischen.



- Wenn alle Proben aller Teilnehmer aller Gruppen des Versuchstages bereitstehen stellen sie diese alle in den Thermocycler, schließen Sie den Deckel des Thermocyclers fest, achten Sie auf festen Kontakt des Deckels mit den Proben. Ihr Betreuer startet dann das entsprechende Programm des Thermocyclers.



- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welche Funktion der Thermocycler hat, und warum diese benötigt wird?
- Wenn der Thermocycler nicht bereits vorprogrammiert ist, erstellen Sie ein Programm, das 3 Schritte in Zyklus 2 beinhaltet. Der abschließende Zyklus 3 stellt sicher, daß die abschließende Kettenvervollständigungsreaktion vollendet wird und alle potentiellen PCR-Endprodukte synthetisiert werden.

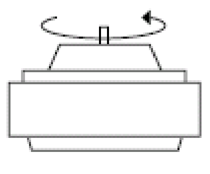
Step	Function	Temperature [˚C]	Duration	Number of cycles
Initial Denature	Denature	94	2 min	×1
Thermal cycling	Denature Anneal Extend	94 52 72	30 sec 30 sec 1 min	×35
Final extend	Extend	72	10 min	×1
Hold	Hold	04	forever	×1

- Das Programm des Thermocyclers benötigt ca. 2 Stunden.
  Ihr Dozent wird Ihre Proben anschließend entnehmen und im Kühlschrank zwischenlagern. Der Versuch wird dann an Versuchstag 4 zuendegeführt.
- Schreiben Sie sich daher unbedingt auf, wie Sie Ihre Proben gekennzeichnet haben.

Teil 2 *(wird durchgeführt an Versuchstag 4)*

Elektrophorese vervielfältigter PCR-Proben und Färbung der Agarose-Gele

- Nehmen Sie Ihre im Thermocycler PCR-amplifizierten Proben aus dem Kühlschrank und lagern Sie diese auf Eis, solange sie sich auf Ihrer Werkbank befinden.
- Zentrifugieren Sie die Proben für einige Sekunden in der Mikrozentrifuge.



Centrifuge

- Machen Sie sich mit dem Verfahren der apparativen OnChip-Elektrophorese-Technik mit dem Agilent BioAnalyzer vertraut.
- Lesen Sie hierzu den unten anhängenden Quick Guide (Quelle: http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=50849&liid=1648)
- Besuchen Sie ggf. die Internet-Seite von Agilent (www.agilent/chem/labonachip und lesen Sie die vollständige Bedienungsanleitung: (http://www.chem.agilent.com/en-US/Search/Library/_layouts/Agilent/PublicationSummary.aspx?whid=46764&liid=1270)

Sollte der Bioanalyzer nicht zur Verfügung stehen, wird eine Gel-Elektrophorese fast genau wie in 3.1.1.FF Versuch: DNA-Fingerprinting (VB4, Altskript V 2.27) durchgeführt, allerdings mit 3%igen Agarose-Gel (statt 1%igem). Beachten Sie in diesem Falle auch, daß Sie zu jeder Probe 10 µl des für die herkömmliche Gelelektrophorese vorgesehenen orange-G loaging dye hinzufügen und auch die für dieses Verfahren vorgesehene Allel-Leiter verwenden.

Setting up the Chip Priming Station



1 Replace the syringe:

- **a** Unscrew the old syringe from the lid of the chip priming station.
- **b** Release the old syringe from the clip. Discard the old syringe.
- **c** Remove the plastic cap of the new syringe and insert it into the clip.
- **d** Slide it into the hole of the luer lock adapter and screw it tightly to the priming station.



2 Adjust the base plate:

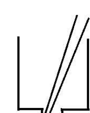
- **a** Open the chip priming station by pulling the latch.
- **b** Using a screwdriver, open the screw at the underside of the base plate.
- **c** Lift the base plate and insert it again in position C. Retighten the screw.

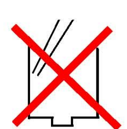
3 Adjust the syringe clip:

- **a** Release the lever of the clip and slide it down to the lowest position.

Essential Measurement Practices

- Handle and store all reagents according to the instructions on the label of the individual box.
- Avoid sources of dust or other contaminants. Foreign matter in reagents and samples or in the wells of the chip will interfere with assay results.
- Keep all reagent and reagent mixes refrigerated at 4 °C when not in use.
- Allow all reagents and samples to equilibrate to room temperature for 30 minutes before use.
- Protect dye and dye mixtures from light. Remove light covers only when pipetting. The dye decomposes when exposed to light and this reduces the signal intensity.
- Always insert the pipette tip to the bottom of the well when dispensing the liquid. Placing the pipette at the edge of the well may lead to poor results.





- Use a new syringe and electrode cleaners with each new Kit.
- Use loaded chips within 5 minutes after preparation. Reagents might evaporate, leading to poor results.
- Do not touch the Agilent 2100 bioanalyzer during analysis and never place it on a vibrating surface.

Agilent DNA 1000 Kit Quick Start Guide

Agilent DNA 1000 Assay Protocol - Edition April 2007

WARNING



Handling DMSO

Kit components contain DMSO. Because the dye binds to nucleic acids, it should be treated as a potential mutagen and used with appropriate care.
Wear hand and eye protection and follow good laboratory practices when preparing and handling reagents and samples. Handle the DMSO stock solutions with particular caution as DMSO is known to facilitate the entry of organic molecules into tissues.

Preparing the Gel-Dye Mix

gel-dye mix
25µl dye

1. Allow DNA dye concentrate (blue ●) and DNA gel matrix (red ●) to equilibrate to room temperature for 30 min.
2. Vortex DNA dye concentrate (blue ●) and add 25 µl of the dye to a DNA gel matrix vial (red ●).
3. Vortex solution well and spin down. Transfer to spin filter.
4. Centrifuge at 2240 g ± 20 % for 15 min. Protect solution from light. Store at 4 °C.

Loading the Gel-Dye Mix





1. Allow the gel-dye mix equilibrate to room temperature for 30 min before use.
2. Put a new DNA chip on the chip priming station.
3. Pipette 9.0 µl of gel-dye mix in the well marked G.
4. Make sure that the plunger is positioned at 1 ml and then close the chip priming station.
5. Press plunger until it is held by the clip.
6. Wait for exactly 60 s then release clip.
7. Wait for 5 s. Slowly pull back plunger to 1ml position.
8. Open the chip priming station and pipette 9.0 µl of gel-dye mix in the wells marked G.

Loading the Markers



1. Pipette 5 µl of marker (green ●) in all 12 sample wells and ladder well. Do not leave any wells empty.

Loading the Ladder and the Samples

1µl ladder
1µl sample

1. Pipette 1 µl of DNA ladder (yellow ●) in the well marked ladder symbol.
2. In each of the 12 sample wells pipette 1 µl of sample (used wells) or 1 µl of de-ionized water (unused wells).
3. Put the chip horizontally in the adapter and vortex for 1 min at the indicated setting (2400 rpm).
4. Run the chip in the Agilent 2100 bioanalyzer within 5 min.

Technical Support In the U.S./Canada: 1-800-227-9770 (toll free); lsca-ibs-support@agilent.com. In Europe: call your local Customer Care Center; bio_solutions@agilent.com. In Japan: 0120 477 111; yan_ccr@agilent.com
In Asia Pacific: call your local Customer Care Center; Bioanalyzer_ap@agilent.com

Further Information Visit Agilent Technologies' unique Lab-on-a-Chip web site. It is offering useful information, support and current developments about the products and the technology: http://www.agilent.com/chem/labonachip.


G2938-90015

Part Number: G2938-90015
Edition 04/2007
Printed in Germany

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Straße 8
76337 Waldbronn, Germany



Das Gel sollte nun vor Start der Messung mit den Proben von 2 Laborgruppen wie folgt beladen sein.

Chip-Slot	Gruppe	Inhalt	Menge
1	I	A	20 µl
2	I	B	20 µl
3	I	C	20 µl
4	I	D	20 µl
5	I	AL	20 µl
6	I	CS	20 µl
7	II	A	20 µl
8	II	B	20 µl
9	II	C	20 µl
10	II	D	20 µl
11	II	AL	20 µl
12	II	CS	20 µl

Quantitative Analyse der als Bandenmuster visualisierten DNA-Fragmente

- Für einen genauen Vergleich zwischen der DNA vom Tatort und der DNA des Tatverdächtigen kann man sich nicht nur auf eine Übereinstimmung nach Augenmaß verlassen, sondern man muß die Fragmentgröße quantitativ bestimmen.
- Bestimmenen Sie anhand Ihrer Meßdaten die relativen Wanderungsstrecken jeder einzelnen Bande.
- Vergleichen Sie die DNA-Bande mit der zugehörigen On-Chip-Allel-Leiter bzw. untereinander und dokumentieren Sie dies in Ihrem Protokoll. Schlußfolgern Sie, welche der DNA-Proben der Tatort-DNA entspricht (siehe dazu auch 3.1.1.FF bzw. biorad.com).
- Wie sicher sind Sie, daß hier eine Übereinstimmung vorliegt? Begründen Sie dies in Ihrem Protokoll.

3.3 Platz 3

3.3.1 DNA-Extraktion

3.3.1.HH Versuch: Wangenzellen-DNA Extraktion: „Gen in der Flasche“ (VB2, Altskript 2.25)

Cheek Cell DNA Extraction: Capture Your Genetic Essence in a Bottle
Biotechnology Explorer™: Genes in a Bottle Kit - DNA Extraction Module
Catalog Number 166-2000EDU, DNA necklace module (166-2200EDU)

- Recherchieren Sie für Ihr Protokoll die Struktur von DNA (Desoxyribonukleinsäure, auch DNA, von engl. desoxy-ribo-nuclein-acid).
- ***Bringen sie zum Versuch möglichst eine eigene Zahnbürste mit***

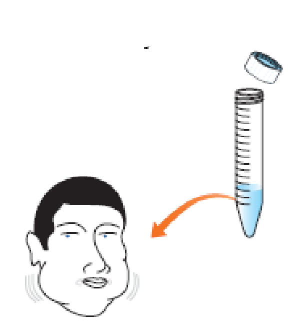
Wie kann man DNA sichtbar machen?

Um Ihre DNA mit bloßem Auge sehen zu können, werden Sie im Rahmen dieses Versuches Wangen-Epithelgewebe aus dem Innenbereich Ihrer Wange ausschaben, die Zellwände aufbrechen, und die gesamte DNA der Zellen eindicken.

Schritt 1: Zellen sammeln

An dem Epithelgewebe Ihrer Wangeninnenseiten befinden sich ständig abgestorbene Zellen in Ablösung und werden durch neu gewachsene Zellen ersetzt, insbesondere bei jedem Kauvorgang. Sie bekommen eine ausreichende Menge, also einige tausend Zellen von der Innenseite Ihrer Wangen, indem Sie in angemessener Weise mit den Zähnen auf Ihrer Wange kauen und dann die so in den Speichel gewanderten Zellen durch Ausspülen mit Wasser gewinnen. Kauen Sie dabei zwar durchaus einige Male fest genug, daß Sie den Widerstand spüren können, es ist aber absolut nicht nötig, so fest zu kauen, daß Sie dabei Schmerzen empfinden (es ist auch nicht angedacht, daß dabei Blut fließt).

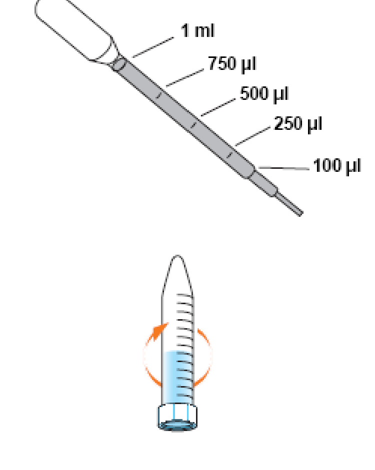
- Nehmen Sie ein 15-ml-Schraubdeckel-Gefäß zur Hand.
- Befüllen Sie es mit 3ml Leitungswasser.
- Beschriften Sie es mit Ihrem Namen.



- Verunreinigungen des für diesen Versuch zu verwendenden Speichels durch Mikroorganismen und/oder rote Blutkörperchen sind nicht erwünscht. Putzen sie daher nun ihr Zähne ohne Zahnpasta. Vermeiden Sie Kontakt der Bürste mit Ihren Wangeninnenseiten, vermeiden Sie auch zu festes Bürsten des Zahnfleisches.
- Schaben Sie etwas auf Ihren Wangen herum.
- Nehmen Sie die 3 ml Wasser aus Ihrem Schraubdeckelgefäß in den Mund und spülen Sie gründlich aus. Verschlucken Sie keine Flüssigkeit.
- Geben die ausgespülte Flüssigkeit zurück in das Schraubdeckelgefäß. Nehmen Sie bei Bedarf ein 50-ml-Gefäß zur Hilfe.
- ***Achtung:*** Entnehmen Sie, bevor Sie weiterarbeiten, mit einer geeigneten Pipette 200 µl der Speichellösung mit den Wangenepithelien und geben Sie dies in ein Flipdeckel-Mikrogefäß zur späteren Verwendung im Versuch 3.4.1.II (PV92-Genlocus)

Schritt 2: Aufbrechen der Zellen durch Lyse der Zellwände

Nachdem Sie wie oben geschildert Ihre Zellen gesammelt haben, müssen die Zellen aufgebrochen werden, damit sich die DNA aus dem Zellinneren in die umgebende Flüssigkeit ergießt. Ein Detergens (eine Art Spülmittel für die Biochemie) löst die Zellemembranen auf – ähnlich wie ein gewöhnliches Spülmittel Fette und Proteine von dreckigem Geschirr löst – da Zellwände und Organell-Membranen im Wesentlichen aus Fetten und Proteinen bestehen.
Das Auflösen der Membranen resultiert in der Freisetzung der DNA. Dieser Prozeß wird Lyse (lysis) genannt, und die Lösung, welche das Detergens enthält, wird Lyse-Puffer genannt.



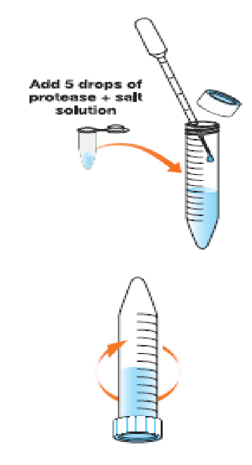
- Nehmen Sie ein 15-ml-Schraubdeckelgefäß zu Hand, das die „Lysis“ enthält und entsprechend beschriftet ist. Benutzen Sie eine frische Plastik-Einwegpipette (1ml) und transferieren Sie damit 2ml (=2×1ml) des Lyse-Puffers in das Schraubdeckelgefäß mit Ihren Wangenepithelien

- Verschließen Sie den Deckel Ihres Schraubdeckelgefäßes mit den in Lyse befindlichen Wangenepithelien fest und wenden Sie es 5× langsam (NICHT fest schütteln)

- Notieren Sie für Ihr Protokoll etwaige Beobachtungen

Schritt 3: Proteine entfernen

Die DNA ist zunächst von Proteinen eng umwunden. Diese Proteine halten, ähnlich wie Garnrollen, die DNA eng gewunden und strukturiert, so daß diese im Zellkern keine Knoten bilden kann.
Damit Sie die DNA mit bloßem Auge sehen können, ist es hilfreich, zunächst die Proteine zu entfernen. Die Protease zerlegt die mit der DNA verknüpften Proteine und ist außerdem nützlich, verbleibende Membranproteine zu verdauen.



- Nehmen Sie das (entsprechend mit „prot“ beschriftete) Flipdeckel-Gefäß, welches Salzlösung mit Protease enthält, zur Hand und pipettieren Sie ca. 50 µl (5 Tropfen) davon in Ihr Schraubdeckelgefäß mit den lysierten Wangenepithelien

- Verschließen Sie den Deckel Ihres Schraubdeckelgefäßes mit den in Lyse befindlichen Wangenepithelien fest und wenden Sie es 5× langsam (NICHT fest schütteln)

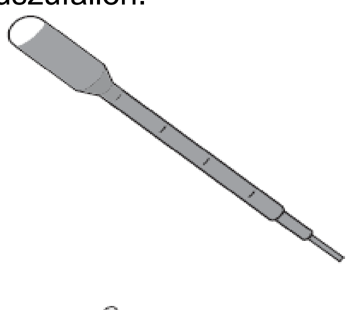
- Inkubieren Sie Ihr Schraubdeckelgefäß (lysiertes Epithel + Protease-Salzlösung) bei 50°C, indem Sie es in einen auf diese Temperatur möglichst genau vorgeheizten Inkubator stellen. Steht ein solcher nicht zur Vefügung, stellen Sie Ihr Gefäß stattdessen in ein warmes Wasserbad (kontrollieren Sie die Temperatur mit dem Thermometer).

Water bath

50°C for 10 min

Schritt 4

Nach Entfernung der Proteine kann sich die DNA lösen, entfalten und sich mit der übrigen DNA der anderen Zellen zusammenklumpen. DNA-Stränge sind zwar zu dünn, um Sie mit bloßem Auge zu sehen, wenn Sie in der Lösung verteilt sind, zusammengeklumpt werden Sie aber sichtbar. In diesem Laborexperiment benutzen Sie Salz und kalten Alkohol, um die DANN aus der Lösung auszufällen.



- Transferieren Sie ca. 10 ml kaltes, hochprozentiges Ethanol (aus dem Kühlschrank)



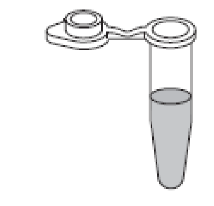
- Halten Sie die Pipettenspitze dabei schräg gegen die Innenwandung Ihres Schraubdeckelgefäßes (lysiertes Epithel + Protease-Salzlösung) und setzen Sie langsam den Alkohol zu

- Lassen Sie das Gefäß dann ruhig stehend ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren

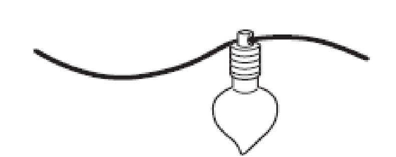
Wie sieht ausgefällte DNA aus?

Schritt 5: Aufbewahrung der sichtbar gemachten DNA

Ähnlich wie Salz oder Zucker ist DNA in gelöstem Zustand farblos, aber weiß, wenn sie in ausreichender Menge ausgefallen ist. Wenn Sie ausfällt, erscheint Sie als feine, weiße in Lösung suspendierte Fäden. Die Fäden sind etwas brüchig – wenn Sie zu grob behandelt werden, können Sie brechen. Wenn diese Masse dann aus der Flüssigkeit genommen wird, klumpt sie weiter zusammen.



- Wenn nicht nur Flipdeckel-Plastik-Gefäße, sondern auch herzförmige Glas-Gefäße für eine Halskette zur Verfügung stehen, transferieren Sie mittels einer Plastik-Einwegpipette die ausgefallene DNA mit ca. 0,75 ml bis 1 ml der Lösung in die Herz-Phiole.
- Ihr Betreuer stellt Ihnen eine Möglichkeit zum Versiegeln der Phiole zur Verfügung. Bitte beachten Sie, daß der verwendete Klebstoff stärker ist, als herkömmlicher Sekundenkleber aus dem Haushalt, das Tragen von Schutzkleidung, insb. von Handschuhen und Schutzbrille ist daher Vorschrift.



- Versiegeln Sie das Gefäß und beglücken Sie Ihre Freunde mit Ihrer DNA.

Anmerkung: der letzte Kurs von Tag 3 setzt die Proben an für 4.1.1.LL und 4.3.1.QQPlatz 2

3.4 Platz 4

3.4.1 Genloci

3.4.1.II Versuch: Analyse des PV 92-Genlocus (VB4, Altskript 2.28)

Teil 1 *(wird durchgeführt an Versuchstag 3)*

- Recherchieren Sie im Vorfeld was eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist, und wie diese funktioniert, insb. in punkto für die Reaktion geeigneter Temperatur.
- Informieren Sie sich über die wichtigsten Englisch-Vokabeln in punkto Genetik und lesen Sie folgende Informationen. Biomedizinische Publikationen sind heutzutage in aller Regel auf Englisch, von daher ist dies seitens Ihres Dozenten ausdrücklich erwünscht.

When RNA is first transcribed from DNA, it contains both coding and noncoding sequences. While RNA is still the nucleus, the noncoding introns (in = stay within the nucleus) are removed from the RNA while the exons (ex = exit the nucleus) are soliced together to form the complete messenger RNA coding sequence for the protein (Abbildung 15). This process is called RNA splicing and carried out by specialized enzymes called spliceosomes.

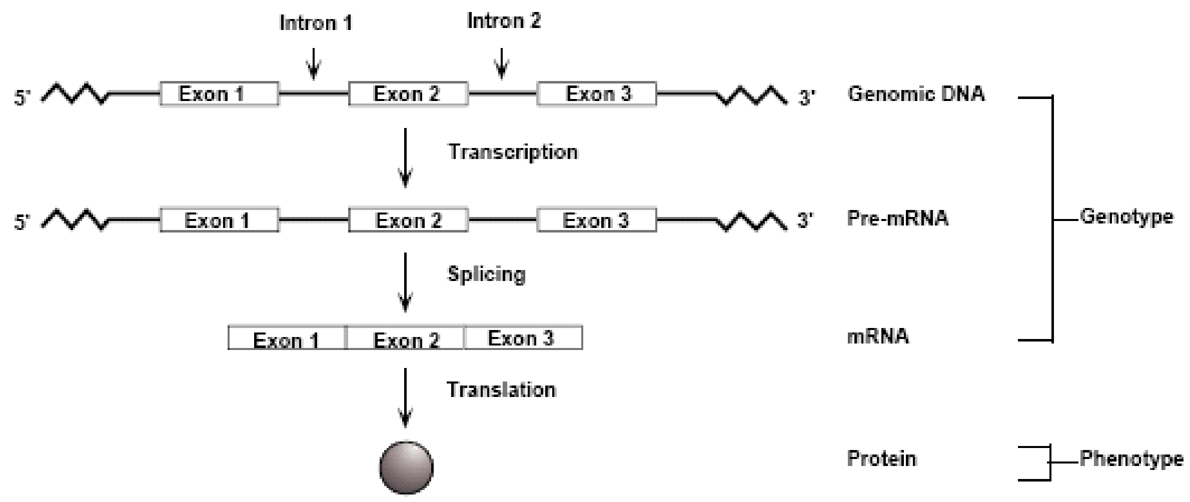


Abbildung 15: Splicing introns from genes

The target sequence

The human genome contains small, repeptitive DNA elements or sequences that have become randomly inserted into it over millions of years. One such repetitive element is called the “Alu sequence” (Abbildung 16). This is a DNA sequence about 300 base pairs long that is repeated almost 500,000 times throughout the human genome. The origin and function of these repeated base pairs is not yet known.

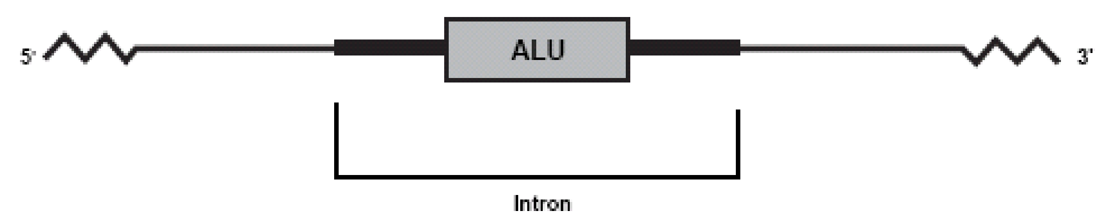


Abbildung 16: Location of an Alu repetitive element within an intron

In this laboratory activity you will look at an Alu element in the PV92 region of chromosome 16. This particular Alu element is dimorphic, meaning that the element is present in some individuals and not others. Some people have the insert in one copy of chromosome 16 (one allele), others may have the insert in both copies of chromosome (Abbildung 17). The presence of absence of this insert can be detected using PCR followed by agarose gel-electrophoresis.
Since you are amplifying a region of DNA contained within an intron, the region of DNA is never really used in your body. So if you don't have it, don't worry.

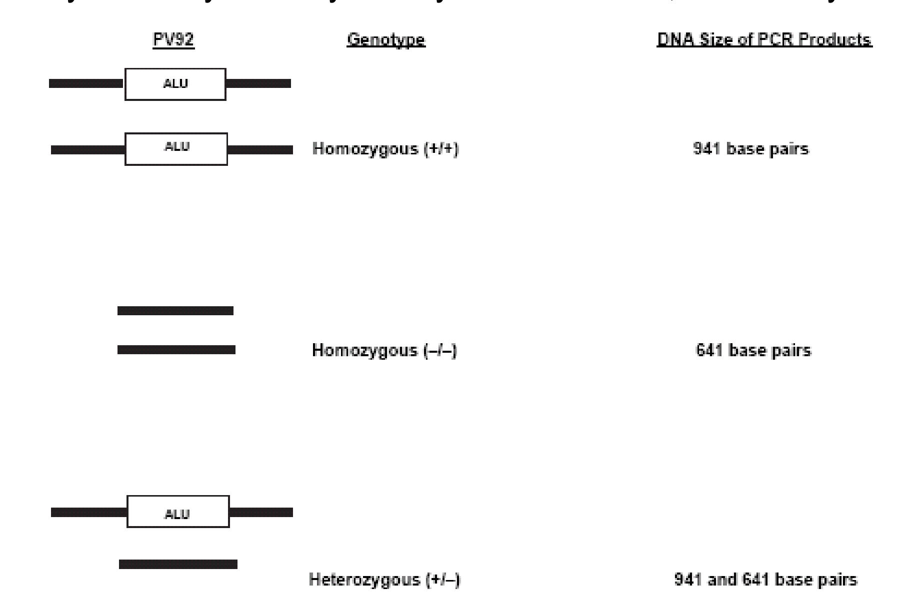


Abbildung 17

Electrophoresis separates DNA fragments according to their relative sizes. DNA fragments are loaded into an agarose gel slab, which is placed into a chamber filled with a conductive buffer solution. A direct current is passed between wire electrodes at each end of the chamber. DNA fragments are negatively charged, and when placed in an electric field, will be drawn toward the positive pole and repelled by the negative pole. The matrix of the agarose gel acts as a molecular sieve through which smaller DNA fragments can move more easily than larger ones. Over a period of time, smaller fragments will travel farther than larger ones. Fragments of the same size stay together and migrate in what appears as a single "band" of DNA in the gel. In the sample gel below (Abbildung 18), PCR-amplified bands of 941 bp and 641 bp are separated based on theirs sizes.

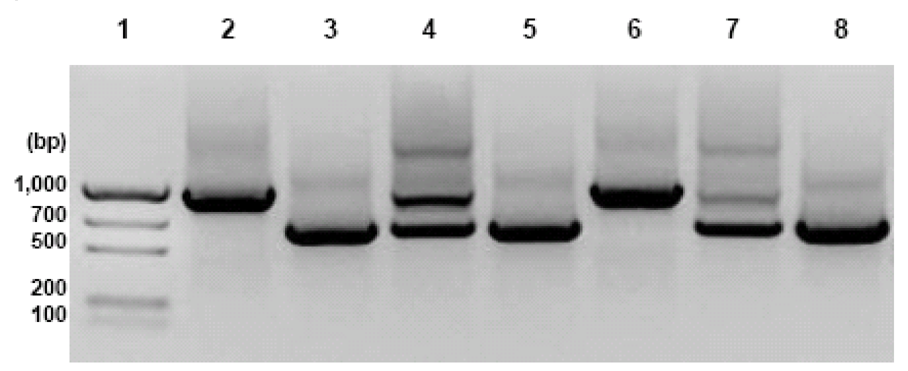


Abbildung 18: Electrophoretic separation of DNA bands based on size. EL Load DNA molecular mass ruler, which contains 1,000 bp, 700 bp, 500 bp, 200 bp, and 100 bp fragments (lane 1); two homozygous (+/+) individuals with 941 bp fragments (lanes 2, 6); three homozygous (-/-) individuals with 641 bp fragments (lanes 3, 5, and 8), and two heterozygous +/-) individuals with 941 and 641 fragments (lanes 4 and 7).

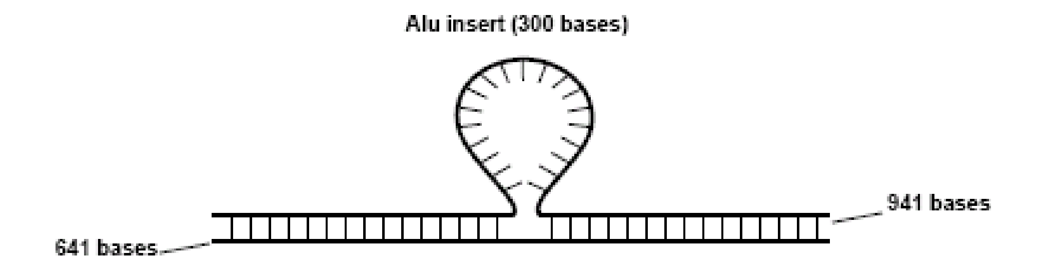
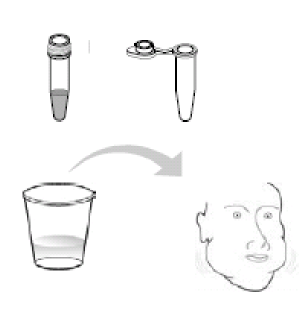


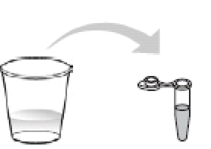
Abbildung 19

a) Cheek Cell DNA Template Preparation

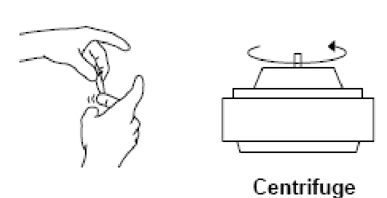
- Beschriften Sie ein Flipdeckel-Mikroprobenröhrchen mit ihrem Namen bzw., Ihren Initialen.



- Nehmen Sie die in Versuch 3.3.1.HH (Versuch: Wangenzellen-DNA Extraktion: „Gen in der Flasche“ (VB2, Altskript 2.25) bereitgestellte Probe zur Hand, die Wangenzellen von Ihnen enthält.



- Stellen Sie die Mikro-Probenröhrchchen in die Zentrifuge, Die Reaktionsgefäße müssen symmetrisch gegeneinander **austariert** in den Rotor positioniert werden (sonst entsteht eine für das Gerät schädliche Unwucht. Lassen Sie die Zentrifuge ca. 10 Minuten mit 6000 g laufen (achten Sie darauf, ob Gravitaion „g“ oder Umdrehungen pro Minute rpm gestellt ist).

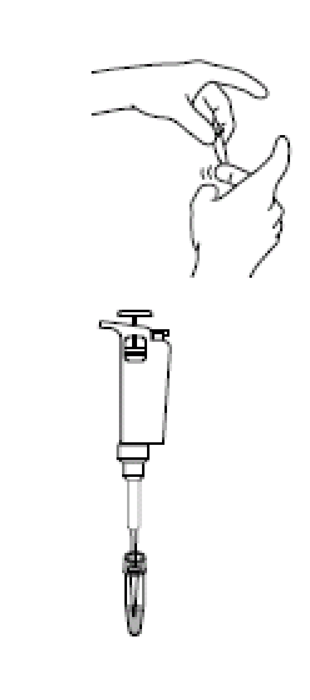


- Am Ende des Zentrifugiervorgangs sollte am Gefäßboden ein kleines blaßweißes Klümpchen, ein sog. Pellet, zu sehen sein. Sollte dies nicht der Fall sein, wiederholen Sie das Zentrifugieren, sollte dann immer noch kein Pellet sichtbar sein, wiederholen Sie auch die Entnahme von Wangenzellen.

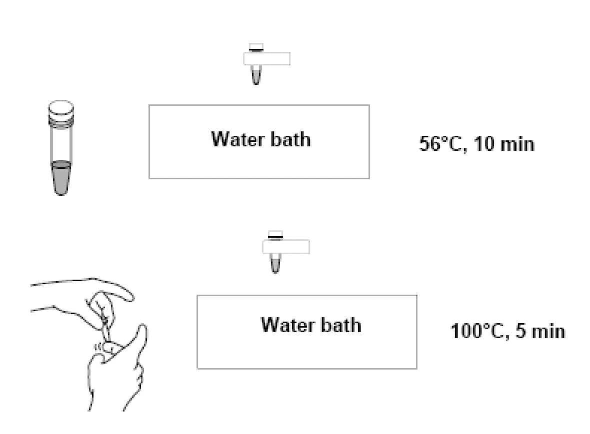


- Entfernen Sie vorsichtig den Überstand. Verwenden Sie zur Sicherheit lieber keine Pipette, sondern dekantieren Sie das Gros der Flüssigkeit und entfernen Sie den Rest der Flüssigkeit mit einem saugfähigen Papiertuch. Saugen Sie auf gar keinen Fall das Pellet an. Das Pellet enthält nämlich Ihre DNA, die es zu untersuchen gilt. Eine kleine Flüssigkeitsmenge (ca. 50 µl) verbleibt dabei über dem Pellet.

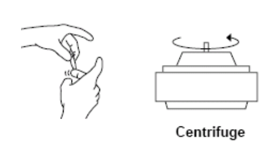
- Schließen Sie den Flipdeckel fest und resuspendieren Sie das Pellet in den verbliebenen Flüssigkeitsüberstand. Schnippen Sie dazu einige Male gegen das Gefäß bzw. verwenden Sie einen automatischen Schüttler. Nicht von Hand wenden und schütteln!. Achten Sie darauf, daß keine Klümpchen ungelöst bleiben.



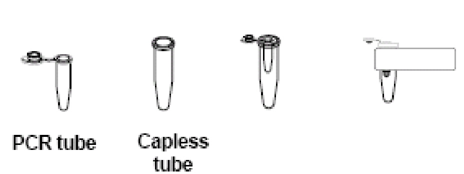
- Nehmen Sie das Schraubdeckelgefäß welches das „InstaGene“ enthält zur Hand.
- Schütteln Sie das InstaGene gründlich direkt kurz vor **jeder** Verwendung.
- Transferieren Sie mittels einer geeigneten Pipette Ihre Zell-Lösung in das Schraubdeckelgefäß mit dem InstaGene.
- Wenn alle Proben Ihrer Gruppe so bereitstehen, stellen Sie diese in einer Schaumstoffhalterung für ca. 10 Minuten bei 56°C in den Inkubator (oder, falls dieser nicht zur Verfügung steht, in ein warmes Wasserbad). Nehmen Sie zwischendurch nach ca. 5 Minuten die Proben kurz aus dem Inkubator heraus und, schütteln Sie diese dann vorsichtig kurz auf (Schnippen oder automatischer Schüttler, nicht wenden), und geben Sie sie schließlich für die verbleibenden 5 Minuten zurück zum Inkubieren.



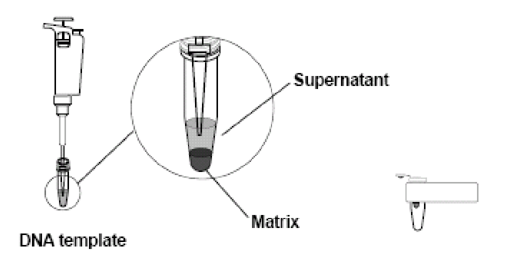
- Zentrifugieren Sie nach jedem Misch- oder Schüttelvorgang für einige Sekunden in der Mikrozentrifuge.
- Entfernen Sie nach dem Inkubieren die Proben, schütteln Sie diese erneut vorsichtig auf. Inkubieren Sie sie dann erneut, diesmal aber bei 100°C, für ca. 5Minuten.



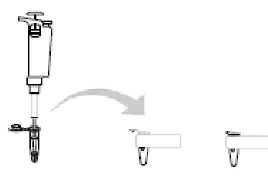
- Entfernen Sie dann die Proben aus dem kochenden Wasserbad und schütteln Sie sie erneut vorsichtig auf. Bringen sie die Zellmatrix erneut in Form eines Pellets, indem Sie sie erneut zentrifugieren, bei 6000 g für ca. 15 Minuten.
- Nehmen Sie einige von der Größe her für den von Ihnen zu verwendenden Thermocycler geeignete PCR-Mikroproben-Flipdeckelgefäße und beschriften Sie diese mit Ihren Initialen.



- Transferieren Sie 20 µl Ihrer in der Lösung befindlichen DNA mittels einer geeigneten Pipette **auf den Boden** des PCR-Gefäßes. Achten Sie diesmal darauf (anders als bei ersten Mal), vom Überstand und **<u>auf keinen Fall vom Pellet</u>** zu nehmen.



- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, was beim ersten Mal Zentrifugieren im Pellet und in der Lösung enthalten war, und was beim zweiten Mal Zentrifugieren im Pellet und in der Lösung enthalten ist.



- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, woraus der Mastermix besteht.
- Nehmen Sie das Probengefäß mit dem gelben „Mastermix" aus dem Kühlschrank, lagern Sie diesen auf Eis, solange er sich auf Ihrer Werkbank befindet. Geben Sie 20 µl Mastermix in jedes PCR-Probenröhrchen, *auch in die Kontrollproben*. Lassen Sie sich ggf. von Ihrem Betreuer zeigen, wie man mit der Pipettenspitze geschickt einmischt. Nehmen Sie für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze. Verschließen sie die Flipdeckel dann fest.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welche Funktion der Thermocycler hat, und warum diese benötigt wird?
- Wenn alle Proben aller Teilnehmer aller Gruppen *inklusive der zugehörigen Kontrollproben* des Versuchstages bereitstehen stellen sie diese alle in den Thermocycler, schließen Sie den Deckel des Thermocyclers fest, achten Sie auf festen Kontakt des Deckels mit den Proben. Ihr Betreuer startet dann das entsprechende Programm des Thermocyclers.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welche Funktion der Thermocycler hat, und warum diese benötigt wird?
- Wenn der Thermocycler nicht bereits vorprogrammiert, erstellen Sie ein Programm, das 3 Schritte in Zyklus 2 beinhaltet. Der abschließende Zyklus 3 stellt sicher, daß die abschließende Kettenvervollständigungsreaktion vollendet wird und alle potentiellen PCR-Endprodukte synthetisiert werden.

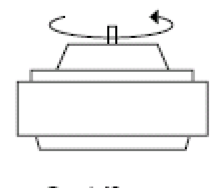
Cycle	Step	Function	Temperature	Time
1	Step 1	Pre-denaturation	94°C	2 minutes
	Repeat 1 time			
2	Step 1	Denature	94°C	1 minute
	Step 2	Anneal	60°C	1 minute
	Step 3	Extend	72°C	2 minutes
	Repeat 40 times			
3	Step 1	Final extension	72°C	10 minutes
	Repeat 1 time			

- Das Programm des Thermocyclers benötigt ca. 3,5 Stunden.
  Ihr Dozent wird Ihre Proben anschließend entnehmen und im Kühlschrank zwischenlagern. Der Versuch wird dann an Versuchstag 4 zuendegeführt.
- Schreiben Sie sich daher unbedingt auf, wie Sie Ihre Proben gekennzeichnet haben.

Teil 2 *(wird durchgeführt an Versuchstag 4*)

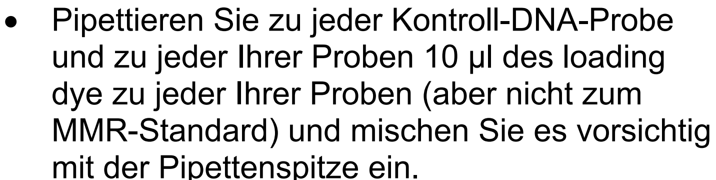
Elektrophorese vervielfältigter PCR-Proben und Färbung der Agarose-Gele

- Nehmen Sie Ihre im Thermocycler PCR-amplifizierten Proben aus dem Kühlschrank und lagern Sie diese auf Eis, solange sie sich auf Ihrer Werkbank befinden.
- Zentrifugieren Sie die Proben für einige Sekunden in der Mikrozentrifuge.
- Nehmen Sie das Mikroprobengefäß mit dem MMR-DNA-Standard zur Hand, lassen Sie es aber zunächst geschlossen und unverändert.
- Nehmen Sie die 3 Kontrollproben mit bekannter Kontroll-DNA zur Hand (+/+ DNA, -/- DNA und +/- DNA).





- Nehmen Sie das Mikroprobengefäß mit der blauen „PV92 XC loading dye“ zur Hand.



- Pipettieren Sie zu jeder Kontroll-DNA-Probe und zu jeder Ihrer Proben 10 µl des loading dye zu jeder Ihrer Proben (aber nicht zum MMR-Standard) und mischen Sie es vorsichtig mit der Pipettenspitze ein.

- Machen Sie sich mit unten anhängender Bedienungsanleitung für das Lonza Flash-Gel-System vertraut. (Quelle: www.lonza.com bzw.

  http://www.lonza.com/group/en/products_services/products/catalog_new.ParSys.0007.File0.tmp?path=eshop/Instructions-tech_sheets/Primary_cells-media/electrophoresis/FlashGel_System_Quick_Start_Guide__18331_.pdf)

- Führen Sie eine Schnell-Elektrophorese mit Lonza-Fertig-Gelen durch.

Sollten Lonza-Schnell-Gele nicht zur Verfügung stehen, führen Sie stattdessen eines der anderen in den vorangegangenen Versuchen beschriebenen Gel-Elektrophorese-Verfahren durch.



Lonza Rockland, Inc.
www.lonza.com
biotechserv@lonza.com
Tech Service: 800-638-8174
Customer Service: 800-341-1574
Document # 18331-1007-06
Rockland, ME 04841 USA

FlashGel® System Quick Start Guide

Important Points:
Refer to Table 1 for recommended sample preparation and run conditions.

Do not exceed 5 µl sample volume per lane.

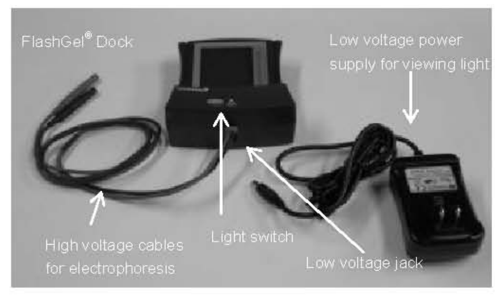
Optimal sample concentrations are approximately 1/5 the typical per band concentration of an ethidium bromide gel.

For best results flood sample wells with water prior to loading, and use FlashGel® Loading Dye and FlashGel® Markers.

Use the FlashGel® Mask when running double-tier cassettes.

CAUTION: Hazardous Voltage. Contact may cause death or serious injury
Caution should be exercised in the operation of this system as it can develop sufficient voltage and current to produce a lethal shock. To avoid any risk of injury, the system should only be operated by properly trained personnel and always in accordance with the instructions provided.

Prior to turning on the DC power source, ensure that the black lead is connected to the negative terminal and the red lead is connected to the positive terminal. Do not touch the FlashGel® Dock or Cassette while the high voltage supply is turned on. Do not flood wells or add samples to the FlashGel® Cassette while the high voltage leads are connected to the power supply.



Technical Service 800-521-0390
biotechserv@lonza.com

Instructions:
1. Tear open pouch and remove cassette.
2. Remove white well seals from cassette. Do not remove the clear side vent seals.
3. Flood sample wells with distilled or deionized water. Tilt cassette to move excess fluid to the edge and blot off with a lint free wipe. Do not blot wells.
4. Insert cassette into dock.
5. Load samples.
6. Plug in high voltage cables and set to recommended voltage.
7. Plug in low voltage power supply and turn on light.
8. Run cassette for recommended time, or until separation of desired fragments is complete.
9. Photograph using standard camera and transilluminator.

TABLE 1

	DNA Cassettes	**RNA Cassettes**
Separation range	1.2%: 50 bp – 4 kb 2.2%: 10 bp – 1 kb	1.2%: 0.5 kb – 9 kb
Sample preparation	For best results, dilute DNA samples in 1X FlashGel Loading Dye.	Denatured RNA samples: Prepare samples in 50% formaldehyde sample buffer and RNase-free water. Denature 5 minutes at 65°C. Native RNA samples: Use FlashGel® Loading Dye.
Sample conc. and detection limits	Optimal DNA load levels are 5-20 ng per band in a 5µl load.	≤ 200 ng per band in a 5µl load.
Voltage & run time	Single-tier: 275 V for 2 – 7 minutes. Double-tier: 275 V for 2 – 5 minutes.	Single-tier: 225 V for 4 – 8 minutes. Double-tier: 225 V for 3 – 5 minutes.

1

Die Bahnen 1 bis 8 sollten nun wie folgt beladen sein:

Lane	Sample	Load Volume
1	MMR (DNA standard)	10 µl
2	Homozygous (+/+) control	10 µl
3	Homozygous (–/–) control	10 µl
4	Heterozygous (+/–) control	10 µl
5	Student 1	20 µl
6	Student 2	20 µl
7	Student 3	20 µl
8	Student 4	20 µl

- Beladen Sie analog dazu die Bahnen 9 bis 16 mit den Proben der nächsten Laborgruppe, bevor Sie die Elektrophorese starten.
- Vergewissern Sie sich, daß alle Verschlüsse korrekt eingerastet und alle Kabel korrekt angeschlossen sind.
- Starten Sie die Elektrophorese.
- Schalten Sie die im Gerät implementierte UV-Lampe nur ein, wenn sich ein Gel in der Kammer befindet.
- Nehmen Sie eine Digital-Kamera zur Hand (Handy-Kamera ist ausreichend) und machen Sie für Ihr Protokoll ein Bild Ihres Gels. Gehen Sie dazu ggf. in einen unbeleuchteten Nebenraum.
- Interpretieren Sie für Ihr Protokoll die Bande Ihres Bildes. Welcher Proband hat welchen PV92-Gentyp?

3.5 *Vorbereitung für Versuchstag 4, nur durchzuführen am letzten Labortermin von Versuchstag 3*

3.5.1 Vorbereitung zur Alkoholischen Gärung Teil I

(aus Enzymkinetik Teil I **(Altskript 3.3)**)

3.5.1.(4.3.1.QQ) Versuch: Aktivität und Kinetik von Alkoholdehydrogenase Teil II (VF 4.4, Altskript V **3.9.2)**

An Versuchstag 4 wird eine alkoholische Lösung benötigt, die zu ihrer Herstellung 2 Tage gären muß. Es ist daher unbedingt erforderlich, daß die letzte Labortermin-Gruppe von Versuchstag 3 für die erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 diese Lösung ansetzt. Der erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 setzt diese dann für die zweite Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 an usw.

- Nehmen Sie 3 Erlenmeyerkolben á 250 ml zur Hand
- Geben Sie in den ersten Kolben 10 g Glucose
- Geben Sie in den zweiten Kolben 10 g Saccharose
- Geben Sie in den dritten Kolben 10 g Fructose
- Füllen Sie die Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Leitungswasser auf.
- Suspendieren Sie darin je 5 g Hefe.
- Verschließen Sie die Kolben mit Gährröhrchen, die Bariumhydroxidlösung (zum CO_2-Nachweis) als Absperrflüssigkeit enthalten.
- Lassen Sie die Kolben 2 Tage auf der Schüttelplatte gären.

3.5.2 Vorbereitung zur MilchSäure-Gärung (Teil I)

(aus Enzymkinetik Teil I **(Altskript 3.3)**)

3.5.1. (4.1.1.LL) Versuch: Reduktion von Methylenblau durch „Reduktionsäquivalente“ aus der bakteriellen Milchsäuregärung (VL 133.4, Altskript V 3.7)

An Versuchstag 4 wird geronnene Milch benötigt, die zu ihrer Herstellung 2 Tage gären muß. Es ist daher unbedingt erforderlich, daß die letzte Labortermin-Gruppe von Versuchstag 3 für die erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 diese ansetzt. Der erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 setzt diese dann für die zweite Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 an usw.

- Vergewissern Sie sich, daß die für diesen Versuch nötige Milch und Naturjoghurt vorrätig sind; kaufen Sie diese bei Bedarf im nächsten Lebensmittelgeschäft (Aldi, Edeka).
- Nehmen Sie 2 Erlenmeyerkolben mit dazugehörigem Glasstopfen zur Hand. Füllen Sie *in eines davon* etwas Naturjoghurt. Füllen Sie nun beide Gefäße mit Milch auf. Verschließen Sie die Kolben luftdicht. Stellen Sie die Gefäße separat beiseite und lassen Sie diese bis zum ersten Termin des vierten Versuchstages stehen, so daß es zur Gerinnung kommen kann. Beschriften Sie die Gefäße.

4 Versuchstag 4: Enzyme (Altskript 3.)

4.0 „Platz 0“:

- Führen Sie an Versuchstag 3 begonnenen Versuche 3.2.1.GG Teilversuch: BioRad Crime Scene Investigator Kit (VB3, Altskript V 2.26) und 3.4.1.II Versuch: Analyse des PV 92-Genlocus (VB4, Altskript 2.28) zuende. Wiederholen Sie im Vorfeld die theoretische Betrachtung dieser Versuchen.

4.1 Platz 1

4.1.1 *Katalyse und Enzymatische Reaktionen* (Altskript 3.1)

4.1.1.JJ Versuch: Katalase in Gewebe / Zerstörung von Enzymen durch Hitze (VL 46.3/4, Altskript V 3.2)

- Vergewissern Sie sich, daß die für diesen Versuch nötige Kartoffel vorrätig ist; kaufen Sie bei Bedarf eine im nächsten Lebensmittelgeschäft (Aldi, Edeka).
- Schneiden Sie eine Kartoffel mittig durch und trennen sie eine Scheibe der Kartoffel von der Mitte ab.
- Stellen sie eine dreiprozentige Wasserstoffperoxidverdünnung bereit (H_2O_2, w=3%).
- Tropfen Sie eininge Tropfen der H_2O_2-Lösung auf und notieren Sie Ihre Beobachtung. Kommt es zu Schaumbildung?
- Schneiden Sie eine weitere Kartoffelscheibe ab.
- Erhitzen Sie mit einem geeigneten Halter ein Geldstück über dem Bunsenbrenner.
- Pressen Sie das Geldstück auf die Kartoffelscheibe, bis ein deutlicher Geruch nach Bratkartoffel auftritt.
- Tropfen Sie erneut eininge Tropfen der H_2O_2-Lösung auf und notieren Sie Ihre Beobachtung. Wo kommt es im Vergleich zu vorher nun zu Schaumbildung?
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welche Art von Reaktion stattgefunden hat. Woraus besteht der Schaum? Wodurch kommt es zur Schaumbildung? Was ermöglicht diese Reaktion? Was verhindert die Reaktion?

4.1.1.KK Versuch: Enzymatische Spaltung von Stärke (VL 46.4, Altskript V 3.3)

- Stellen Sie für jede Gruppe 5 ml einprozentiger Stärkelösung bereit (w=1%).
- Erwärmen Sie die Stärkelösung im Wasserbad bei 37°C.
- Füllen Sie als Blindprobe 1 ml Stärkelösung (OHNE Amylase bzw. Speichelzugabe) in ein separates Reagenzglas.
- Tropfen KJ_3-Lösung zur Blindprobe und notieren Sie Ihre Beobachtung.
- Geben Sie etwas von Ihrem Speichel (enthält Amylase) direkt in die erwärmte Stärkelösung.
- Geben Sie in ein separates Reagenzglas 1 ml der Stärke+Amylase-Lösung und einige Tropfen KJ_3-Lösung und notieren Sie Ihre Beobachtungen. Ziehen Sie zum Vergleich 2.1.1.T Versuch: Hydrolyse von Stärke (VL22.3, Altskript V 2.10) Abbildung 6: Jod-Stärke-Einschlussverbindung heran.
- Wiederholen Sie den KJ_3-Test alle 2min, insg. 5x.
- Notieren Sie erneut Ihre Beobachtungen.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, welche Schlußfolgerung sich aus Ihren Beobachtungen ziehen läßt. Welche Reaktion hat stattgefunden?

4.1.1.LL Versuch: Milchsäuregärung (VL 132.1, Altskript V 3.6)

An Versuchstag 4 wird geronnene Milch benötigt, die zu ihrer Herstellung 2 Tage gären muß. Es ist daher unbedingt erforderlich, daß die letzte Labortermin-Gruppe von Versuchstag 3 für die erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 diese ansetzt. Der erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 setzt diese dann für die zweite Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 an usw.

- Vergewissern Sie sich, daß die für diesen Versuch im weiteren Verlauf nötige Milch und Naturjoghurt vorrätig sind; kaufen Sie diese bei Bedarf im nächsten Lebensmittelgeschäft (Aldi, Edeka).
- Nehmen Sie die beim letzen Labortermin angesetzte Gefäße mit Milch bzw. Milch+Naturjoghurt zur Hand.
- Trennen Sie ggf. das Eiweiß von der Molkeflüssigkeit ab, indem Sie die Milch jeweils durch ein feines Tuch filtrieren.
- Nehmen Sie pH-Indikator zur Hand.
- Nehmen Sie **NICHT** das pH-Meter, damit dessen Elektroden nicht verunreinigt werden.
- Messen Sie den pH-Wert der Molkeflüssigkeit möglichst nur mit Indikator und notieren Sie das Ergebnis für Ihr Protokoll. Warten Sie einige Momente, bis sich aufgrund der Durchmischung der entsprechende pH-Wert stabil eingestellt hat.

- Nehmen Sie 2 Erlenmeyerkolben mit dazugehörigem Glasstopfen zur Hand. Füllen Sie *in eines davon* etwas Naturjoghurt. Füllen Sie nun beide Gefäße mit Milch auf. Verschließen Sie die Kolben luftdicht. Stellen Sie die Gefäße separat beiseite und lassen Sie diese bis zum ersten Termin des vierten Versuchstages stehen, so daß es zur Gerinnung kommen kann. Beschriften Sie die Gefäße.

4.1.1.MM Versuch: Reduktion von Methylenblau durch „Reduktionsäquivalente“ aus der bakteriellen Milchsäuregärung (VL 133.4, Altskript V 3.7)

- Nehmen Sie das beim letzen Labortermin angesetzte Gefäß mit Sauermilch zur Hand (siehe 4.1.1.LL Versuch: Milchsäuregärung (VL 132.1, Altskript V 3.6) bzw. 3.5.2 Vorbereitung zur MilchSäure-Gärung (Teil I).
- Nehmen Sie Methylenblaulösung zur Hand (25 mg auf 250 ml destilliertes H_2O)
- Geben Sie 10ml der Sauermilch in ein Schraubdeckelreagenzglas (16X100) und tropfen Sie solange von der Methylenblaulösung hinzu, bis eine deutliche Blaufärbung auftritt.
- Stellen Sie das Reagenzglas in ein Wasserbad mit 25°C.
- Beobachten Sie die Farbveränderung in Laufe des verbleibenden Labortages und notieren Sie Ihre Beobachtung.
- Überlegen Sie weshalb die Farbe in der Milchprobe nicht gleichmäßig verschwindet.
- Welche Beobachtung ergibt sich bei raschem Umschütteln der Probe?.
- Wie lassen sich die Farbänderungen deuten, welche Ursachen könnten dafür maßgeblich sein (Methylenblau wird leicht zu farblosem Leukomethylenblau reduziert, von Luftsauerstoff aber wieder oxidiert)?

4.2 Platz 2

4.2.1 Isolierung von Enzymen aus biologischem Material (Altskript 3.2)

4.2.1.NN Versuch: Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe (EC 1.1.1.1) (VF 4.8, Altskript V 3.8)

Hefen haben sehr widerstandsfähige Zellwände und müssen daher mechanisch durch Zusatz von Sand o.ä. unter heftiger Bewegung aufgeschlossen werden.

Ihre Aufgabe besteht darin ADH aus Bäckerhefe zu isolieren.

- Stellen Sie hierzu für jede Gruppe 10 ml 70 mM Na_2HPO_4-Lösung bereit.
- Verrühren Sie 10g Bäckerhefe in 10ml 70 mM Na_2HPO_4-Lösung.
- Geben 10 g bis 15 g Quarzsand hinzu.
- Zerreiben die Mischung mindestens 5 Minuten lang kräftig im Porzellanmörser.
- Lassen Sie die Hauptmenge Sand im Mörser zurück und zentrifugieren aus dem Homogenat die Zellen und Zellfragmente mind. 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 4000 g) ab (gegenüberliegendes Zentrifugenröhrchen möglichst genau austarieren!).
- Pipettieren Sie vorsichtig den gelblich-klaren Überstand ab und notieren Sie für Ihr Protokoll das ungefähre Volumen.
- Stellen Sie diese Probe bereit zur Enzymaktivitätsmessung für 4.2.1.OO Versuch: Aktivitätsmessung von ADH (VF 4.4 bzw. 3.9.1)).

4.2.1.OO Versuch: Aktivitätsmessung von ADH (VF 4.4 bzw. 3.9.1)

Ihre Aufgaben bestehen aus einem spektroskopischen ADH-Test mit aus Hefe gewonnenem Enzym (aus 4.2.1.NNVersuch: Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe **(EC 1.1.1.1) (VF 4.8, Altskript V 3.8)** , daraus resultierend die Berechnung der Enzym-Aktivität, und der Bestimmung des K_m-Wertes für Ethanol.

Der Enzymtest wird dabei mit Ethanol als Substrat im Überschuß durchgeführt.
Bei alkalischem pH-Wert und durch Abfangen des Reaktionsproduktes ist die Geschwindigkeit der NAD^+-Reduktion der Enzymmenge proportional.
Meßgröße ist die Extinktionszunahme bei 340 nm.

- Stellen Sie 3 M Ethanol-Lösungen bereit:
- Stellen Sie 0,1 M Na-pyrophosphat/ Glycin-Puffer pH 9 bereit,
- Stellen Sie Reagenztabletten bereit (enthalten NAD^+ / Aldehyd-Dehydrogenase).

Aktivitätsmessung:
- Lösen Sie eine Reagenztablette in 10 ml Puffer.
- Geben Sie in ein Reagenzglas 2 ml dieser Mischung und 20 µl 3 M Alkoholstandard.
- Nehmen Sie eine Stoppuhr zur Hand. Bereiten Sie eine Zeittabelle vor (s.u.).
- Mischen Sie zum Zeitpunkt t=0 (Stoppuhr) 20µl Enzymlösung zu.
- Messen Sie die Extinktion nach 15 s, 30 s, 1min, 2min, 3 min, 4 min, 5min und notieren Sie diese für Ihr Protokoll.
- Wiederholen Sie den Versuch noch 2 weitere Male, dann allerdings mit 50 µl und dann mit 100 µl Enzymlösung (anstelle der zuerst verwendeten 20 µl).
- Variieren Sie ggf. die Menge an Enzymlösung bzw. die Verdünnung der ausgegebenen ADH so, daß die Extinktionsänderung 0,1 pro Minute bei Anfangsgeschwindigkeit nicht überschreitet; höhere Geschwindigkeiten sind schlecht auszuwerten. Die Anfangsgeschwindigkeit wird mit einer Tangente grafisch bestimmt.
- Rechnen Sie die gemessenen Extinktionsänderungen ΔE/min in Δc und Stoffmenge/min um und tabellieren die Werte als Anfangsgeschwindigkeit v_0 bei der jeweiligen Substratkonzentration c.
- Berechnen Sie die Aktivität bez. Auf 1 g Hefe in Units/min oder in kat (=1 mol/sek).

4.3 Platz 3

4.3.1 Enzymkinetik Teil I (Altskript 3.3)

4.3.1.PP Versuch: Aktivität und Kinetik von Alkoholdehydrogenase Teil II (VF 4.4, Altskript V 3.9.2)

Bestimmung von K_m :

- Lösen Sie 2 Reagenztabletten in 20 ml Puffer.
- Geben Sie in 8 Reagenzgläser je 2 ml des Puffers.
- Geben Sie in die ersten 4 Reagenzgläser 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl des 3 mM Alkoholstandards zu und die die verbleibenden 4 Reagenzgläser 10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl des 30 mM Alkoholstandards
- Beschriften Sie die Gläser mit Konzentration UND Menge. .
- Nehmen Sie eine Stopuhr zur Hand und bereiten Sie ein Zeittabelle vor.
- Mischen Sie zum Zeitpunkt t=0 (Stoppuhr) 10 µl reiner, vorgefertigter Enzymlösung (**NICHT** aus Hefe) zum ersten Reagenzglas hinzu.
  Mischen Sie dabei zügig ein.
- Messen Sie die Extinktion nach 15 s, 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min.
  Beenden Sie die aktuelle Messung, sobald die Extinktion ≥1 beträgt.
  Meist ist dies lange vor Ablauf der Maximaldauer von 5 Minuten der Fall.
- Tragen Sie die Substratkonzentrationen gegen die Geschwindigkeiten v (µmol/min) direkt auf und zeichnen Sie die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk, aus der Sie K_m (1/ K_m) und V_{max} (1/v_{max}) entnehmen können.
  Vergleichen Sie mit Angaben aus Literatur bzw. Internet.

4.3.1.QQ Alkoholische Gärung Teil I (VL 133.1/2) (V 3.5 bzw 3.9)

An Versuchstag 4 wird eine alkoholische Lösung benötigt, die zu ihrer Herstellung 2 Tage gären muß. Es ist daher unbedingt erforderlich, daß die letzte Labortermin-Gruppe von Versuchstag 3 für die erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 diese Lösung ansetzt. Der erste Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 setzt diese dann für die zweite Labortermin-Gruppe von Versuchstag 4 an usw.

- Nehmen Sie die beim letzten Labortermin angesetzten vergorenen Zuckerlösungen zur Hand.

Die Gärröhrchen werden unter Aufsicht Ihres Dozenten (i.d.R. für alle Gruppen zusammen im Hörsaal) durch ein dünnes Glasrohr von 50 cm Länge ersetzt.
Die Kolben werden bis zum Sieden erhitzt.
Die entweichenden Dämpfe lassen sich entzünden (qualitativer Alkoholnachweis).
Notieren und kommentieren Sie in Ihrem Protokoll Ihre Beobachtungen.

- Nehmen Sie 3 Erlenmeyerkolben á 250 ml zur Hand
- Geben Sie in den ersten Kolben 10 g Glucose
- Geben Sie in den zweiten Kolben 10 g Saccharose
- Geben Sie in den dritten Kolben 10 g Fructose
- Füllen Sie die Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Leitungswasser auf.
- Suspendieren Sie darin je 5 g Hefe.
- Verschließen Sie die Kolben mit Gährröhrchen, die Bariumhydroxidlösung (zum CO_2-Nachweis) als Absperrflüssigkeit enthalten.
- Lassen Sie die Kolben 2 Tage auf der Schüttelplatte gären.

4.3.1.RR Alkoholische Gärung Teil II (VF 4.4, Altskript V 3.9.3)

Alkohol-Bestimmung:

- Verdünnen Sie die Proben der alkoholischen Gärung (4.3.1.QQ Alkoholische Gärung Teil I (VL 133.1/2) (V 3.5 bzw 3.9) Teil I bzw. 3.5.1 Vorbereitung zur Alkoholischen Gärung Teil I) im Verhältnis 1:500 bzw. 1:1000.
- Lösen Sie eine Reagenztablette in 10ml Puffer und geben Sie 100 µl Enzymlösung zu.
- Für die Messung verwenden Sie je 2 ml der Mischung und 100 µl der verdünnten Probe.
- Setzen Sie zusätzlich einen Blindwert mit 100 µl Wasser an.
- Messen Sie die Extinktion nach 20 min (molarer Extinktionskoeffizient von NADH: 6400 M^{-1} cm^{-1} (340 nm, pro mol Alkohol werden 2 mol NADH gebildet).

4.4 Platz 4

4.4.1 Enzymkinetik Teil II (Altskript 3.3)

4.4.1.SS Versuch: Substrathemmung der Urease-Reaktion (VL 47.6, Altskript V 3.10)

Ein in Mikroorganismen und Pflanzen verbreitetes, sehr aktives Enzym ist die Harnstoff spaltende Urease (EC 3.5.1.5):

$$NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 + 2\ H_2O \rightarrow 2\ NH_4^+ + CO_3^{2-}$$

- Stellen Sie 1mM Citratpuffer mit pH 6 bereit.
- Lösen Sie hierzu 100 mg Zitronensäure in 500 ml Wasser und stellen Sie diese mithilfe eines zuvor kalibrierten pH-Meters durch Zugabe von 1M NaOH auf pH 6,0 ein.
- Lösen Sie 10 g Harnstoff in 100 ml des Citratpuffer und stellen dies erneut auf pH 6 ein, indem Sie ggf. mit 1M HCl und/oder 1M NaOH korrigieren.
- Geben Sie in 6 Reagenzgläser steigende Mengen dieser Harnstofflösung (50 µl, 200 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml und 5 ml), füllen Sie mit dem Citratpuffer jeweils auf 5 ml auf und stellen Sie die Proben in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad.
- Stellen Sie 0,5 ml Bromthymolblau (20 mg auf 50 ml H_2O) bereit.
- Geben Sie dann je 0,5 ml der Bromthymolblaulösung hinzu. Dieser Indikator schlägt während einer pH-Wert-Erhöhung bei pH 6 von gelb nach grün und bei pH 7,6 von grün nach blau um.
- Stellen Sie für jede Gruppe 0,1 ml Urease-Lösung (10U/ml) bereit.
- Pipettieren Sie im Abstand von jeweils genau 30s je 0,1 ml der Urease-Lösung zu, mischen Sie und stellen Sie diese wieder ins Wasserbad.
- Bestimmen Sie für jede Probe die Reaktionszeit bis zum Umschlag des Indikators und tragen Sie sie als bei der Auswertung in Ihrem Protokoll Graph gegen die Harnstoffmenge auf.

4.4.1.TT Versuch: Vergiftung und Reaktivierung eines Enzyms: Urease (VF 4.3, Altskript V 3.11)

- Stellen Sie für jede Gruppe je 3 Reagenzgläser mit je 2 ml zehnprozentiger Harnstoff-Lösung (w=10%) bereit.
- Versetzen Sie diese jeweils mit 0,5 ml des Indikators Bromthymolblau
- Dieser Indikator schlägt während einer pH-Wert-Erhöhung bei pH 6 von gelb nach grün und bei pH 7,6 von grün nach blau um.
- Stellen Sie für jede Gruppe je 1 ml Urease-Lösung (10U/ml) bereit.
- Fügen Sie zu einem der Reagenzgläser 1 ml der Urease-Lösung zu und beobachten Sie die Farbveränderung. Notieren Sie Ihre Beobachtung für Ihr Protokoll.
- Steht ein Leitfähigkeitsmeßgerät zur Verfügung, so verfolgen Sie die Harnstoffspaltung auch damit.
- Überlegen Sie für Ihr Protokoll, wieso sich die Leitfähigkeit der Lösung ändert.

Wie viele andere Katalysatoren wird Urease durch kleine Mengen von Schwermetallen "vergiftet", die an Enzymgruppen binden, die für die Katalyse essentiell und besonders exponiert und reaktiv sind; häufig sind dies SH-Gruppen der Aminosäure Cystein.

- Stellen Sie 0,1 M $CuSO_4$-Lösung bereit.
- Stellen Sie 0,1 M Cystein-Lösung bereit.
- Geben Sie zu den weiteren Reagenzgläsern mit Harnstoff-Lösung und Indikator
  1.) *nur* 1 Tr. 0,1 M $CuSO_4$, bzw.
  2.) *erst* je 0,5 ml einer neutralisierten (pH 6) 0,1 M Cystein-Lösung
  und dann wiederum 1 Tr. 0,1 M $CuSO_4$.
- Dann versetzen Sie auch diese Gläser mit der Enzym-Lösung und vergleichen die Urease-Wirkung.
- Erklären Sie in Ihrem Protokoll die Schutzfunktion von Cystein gegen Schwermetall-Inaktivierung.